



Détermination de résidus de médicaments et ses métabolites dans les plantes sauvages. Essais d'exposition et évaluation de la bioactivité

Sofía Barreales Suárez

► To cite this version:

Sofía Barreales Suárez. Détermination de résidus de médicaments et ses métabolites dans les plantes sauvages. Essais d'exposition et évaluation de la bioactivité. Chimie analytique. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019); Universidad de Sevilla (Espagne), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4086 . tel-03232977

HAL Id: tel-03232977

<https://theses.hal.science/tel-03232977>

Submitted on 23 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \mathbf{T} + \mathbf{f}$$

$$e^{i\pi} + 1 = 0$$

THÈSE DE DOCTORAT TESIS DOCTORAL

Détermination de résidus de médicaments et ses
métabolites dans les plantes sauvages. Essais
d'exposition et évaluation de la bioactivité

Determinación de residuos de fármacos y sus
metabolitos en plantas silvestres. Ensayos de
exposición y evaluación de la bioactividad

Sofía BARREALES SUÁREZ

Molécules Bioactives/ Química Analítica

Présentée en vue de l'obtention

du grade de docteur en Chimie avec mention
internationale **d'Université Côte d'Azur**
et d'Universidad de Sevilla

Dirigée par : Stéphane Azoulay/ Miguel Ángel
Bello López/ Rut María Fernández Torres

Co-encadrée par : Rut María Fernández Torres

Soutenue le : 22 /11/ 2019

**Presentado en vista de la obtención del grado
de doctor en :** Química con mención
internacional **de la** Université Côte d'Azur
y de la Universidad de Sevilla

Dirigida por : Miguel Ángel Bello López/
Stéphane Azoulay/ Rut María Fernández Torres

Tutorizada por : Rut María Fernández Torres

Defendida el : 22/ 11/ 2019

Devant le jury, composé de :

Delante del tribunal, compuesto por :

José Luis Gómez Ariza, Professeur, Universidad de Huelva
(Université de Huelva, Espagne)

Tamara García Barrera Professeur, Universidad de Huelva
(Université de Huelva, Espagne)

Mercedes Villar Navarro, Maître de conférences

Universidad de Sevilla (Université de Séville, Espagne)

Audrey Di Giorgio, Maître de conférences HDR

Université Nice Sophia Antipolis (Universidad Nice
Sophia Antipolis, Niza, Francia)

Juan Luis Pérez Bernal, Associate Professor Universidad
de Sevilla (Université de Séville, Espagne)

Détermination de résidus de médicaments et ses métabolites dans les plantes sauvages. Essais d'exposition et évaluation de la bioactivité

Determinación de residuos de fármacos y sus metabolitos en plantas silvestres. Ensayos de exposición y evaluación de la bioactividad

Jury :

M. José Luis GÓMEZ-ARIZA, Professeur - Université de Huelva (Espagne)

Mme. Tamara GARCÍA-BARRERA, Professeur - Université de Huelva (Espagne)

Mme. Mercedes VILLAR-NAVARRO, Maître de conférences - Université de Séville (Espagne)

Mme. Audrey DI GIORGIO, Maître de conférences HDR - Université Nice Sophia Antipolis

M. Juan Luis PÉREZ-BERNAL, Associate Professor - Université de Séville (Espagne)

Président du jury :

M. José Luis GÓMEZ-ARIZA, Professeur, Universidad de Huelva (Université de Huelva, Espagne)

Rapporteurs :

M. José Luis GÓMEZ-ARIZA, Professeur, Universidad de Huelva (Université de Huelva, Espagne)

Mme. Tamara GARCÍA-BARRERA, Professeur, Universidad de Huelva (Université de Huelva, Espagne)

Examineurs:

Mme. Mercedes VILLAR-NAVARRO, Maître de conférences - Université de Séville (Espagne)

Mme. Audrey DI GIORGIO, Maître de conférences HDR - Université Nice Sophia Antipolis

M. Juan Luis PÉREZ-BERNAL, Associate Professor - Université de Séville (Espagne)

Tribunal:

D. José Luis GÓMEZ ARIZA, Catedrático- Universidad de Huelva (Presidente)

Dña. Tamara GARCÍA BARRERA, Catedrática- Universidad de Huelva

Dña. Mercedes VILLAR NAVARRO, Profesora titular – Universidad de Sevilla

Dña. Audrey DI GIORGIO, Profesora titular - Université Nice Sophia Antipolis (Niza, Francia)

D. Juan Luis PÉREZ BERNAL, Profesor contratado doctor- Universidad de Sevilla

Détermination de résidus de médicaments et ses métabolites dans les plantes sauvages. Essais d'exposition et évaluation de la bioactivité

Actuellement, la présence de substances pharmacologiques dans l'eau utilisée pour l'irrigation ou dans les matrices végétales est un problème pour l'environnement. En effet, il est de plus en plus nécessaire d'évaluer, surveiller et faire un diagnostic environnemental des zones affectées par la pollution afin de connaître les écosystèmes endommagés par la présence de polluants et ainsi évaluer les conséquences de ceux-ci sur les êtres vivants. Par conséquent, cette thèse se concentre sur les effets de la pollution afin d'accroître la connaissance de ses conséquences sur la flore indigène du Parc National de Doñana (Espagne), en fournissant des données qualitatives et quantitatives sur l'effet des substances pharmacologiquement actives (considérées comme polluants émergents) chez trois espèces de plantes typiques de cette région.

De plus, les études, simulant à l'échelle du laboratoire la présence de principes actifs pharmacologiques, de leurs composés de dégradation et de leurs métabolites dans les matrices végétales de cet environnement naturel, évaluant également la capacité antioxydante et enzymatique ainsi que l'identification des molécules inhibitrices des enzymes utilisées dans cette étude dans une collection de 150 plantes du milieu protégé mentionné précédemment sont pratiquement inexistantes.

Une procédure analytique a été optimisée et validée par chromatographie liquide à haute performance avec détection par spectrométrie de masse au temps de vol pour l'identification et la quantification de six principes pharmacologiques actifs, carbamazépine, fluméquine, ciprofloxacine, enrofloxacine, ibuprofène et diclofénac, en extraits de trois espèces végétales, *Lavandula dentata* et *Juncus sp.* et *Salicornia europaea*, espèces présentes dans différents habitats du Parc National de Doñana.

Un essai d'exposition a été conçu et réalisé, irriguant les plantes sélectionnées avec des solutions aqueuses contenant des concentrations variables de produits pharmaceutiques. Les échantillons ont été analysés à 7, 15, 21 et 30 jours (fin du test) et l'accumulation des substances sélectionnées a été déterminée. De plus, des techniques d'analyse non ciblées à l'aide d'un logiciel approprié (MetabolyxTM) ont été appliquées aux données des échantillons soumis à l'étude d'absorption afin d'identifier les métabolites et les produits de dégradation possibles et les voies métaboliques en cause.

En outre, certaines méthodes ont été optimisées pour évaluer les activités antioxydantes et inhibitrices, en utilisant différentes enzymes (tyrosinase, élastase, collagénase et lipoxygénase), dans les extraits d'une sélection de 150 espèces végétales collectées et présentes dans le Parc

National de Doñana, et/ou leur environnement, les échantillons ont été extraits à l'aide de solvants de polarité et de capacité d'extraction différentes : hexane, éthanol, eau : éthanol (1:1, v/v) et acétate d'éthyle. Ces méthodes ont été appliquées pour évaluer la capacité d'inhibition enzymatique ainsi que la capacité antioxydante des extraits et dans des échantillons choisis parmi les tests d'exposition indiquant comme prévu l'augmentation de la capacité inhibitrice des enzymes dans les échantillons soumis à de fortes concentrations de solutions dopantes. Une relation métabolique a été établie entre les molécules bioactives possibles d'extraits végétaux qui ne sont pas documentées dans la littérature pour leur activité d'inhibition enzymatique et les inhibiteurs connus de ces enzymes, expliquant ainsi l'existence d'une activité inhibitrice.

Mots-clés : *Lavandula dentata*; *Juncus sp.*; *Salicornia europaea*; médicaments; essais d'exposition; carbamazépine; fluméquine; ciprofloxacine; enrofloxacin; ibuprofène; diclofénac; Parc National de Doñana; métabolites; enzymes; inhibition enzymatique; tyrosinase; lipoxygénase; collagénase; élastase; antioxydants.

Determinación de residuos de fármacos y sus metabolitos en plantas silvestres. Ensayos de exposición y evaluación de la bioactividad

Actualmente, la presencia de sustancias farmacológicas en el agua utilizada para el riego o en las matrices de las plantas es un problema para el medioambiente, siendo cada vez, más necesario evaluar, monitorizar y realizar un diagnóstico medioambiental de las zonas afectadas por la contaminación para conocer los ecosistemas dañados por la presencia de los contaminantes y así evaluar la consecuencia de estos en los seres vivos. Por lo tanto, esta tesis centra su estudio en los efectos de la contaminación para aumentar el conocimiento de sus consecuencias sobre la flora autóctona del Parque Nacional de Doñana (España), aportando datos cualitativos y cuantitativos sobre el efecto de las sustancias farmacológicamente activas (consideradas como contaminantes emergentes) sobre tres especies vegetales típicas de esta región.

Prácticamente son inexistentes los estudios que simulan a nivel de laboratorio la presencia de principios activos farmacológicos, sus compuestos de degradación y metabolitos en las matrices de las plantas en este medio natural, evaluando también la capacidad antioxidante y enzimática, así como la identificación de las moléculas inhibidoras de las enzimas utilizadas en este estudio en un conjunto de 150 plantas del mencionado entorno protegido.

Se ha optimizado y validado un procedimiento analítico mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas en tiempo de vuelo para la identificación y cuantificación de seis principios activos farmacológicos, carbamazepina, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacin, ibuprofeno y diclofenaco, en extractos de tres especies de plantas, *Lavandula dentata* y *Juncus sp.* y *Salicornia europaea*, especies presentes en diferentes hábitats del Parque Nacional de Doñana

Se ha diseñado y llevado a cabo una prueba de exposición, regando las plantas seleccionadas con soluciones acuosas que contenían concentraciones variables de productos farmacéuticos. Las muestras se analizaron a los 7, 15, 21 y 30 días (final de la prueba) y se determinó la acumulación de las sustancias seleccionadas. Asimismo, se aplicaron técnicas analíticas no específicas utilizando programas informáticos adecuados (MetabolyxTM) a los datos de las muestras del estudio de absorción para identificar posibles metabolitos, productos de degradación y las vías metabólicas implicadas.

Además, se han optimizado algunos métodos para evaluar las actividades antioxidantes e inhibidoras, utilizando diferentes enzimas (tirosinasa, elastasa, colagenasa y lipoxigenasa), en extractos de una selección de 150 especies de plantas recolectadas y presentes en el Parque Nacional de Doñana, y/o su entorno, las muestras se extrajeron utilizando disolventes de diferente

polaridad y capacidad de extracción: hexano, etanol, agua: etanol (1:1, v/v) y acetato de etilo. Estos métodos se aplicaron para evaluar la capacidad de inhibición de las enzimas, así como la capacidad antioxidante de los extractos y en muestras seleccionadas a partir de ensayos de exposición, lo que indica, como era de esperar, el aumento de la capacidad inhibitoria de las enzimas en muestras sometidas a altas concentraciones de soluciones de dopantes. Se ha establecido una relación metabólica entre las posibles moléculas bioactivas de extractos de plantas que no están documentadas en la literatura por su actividad inhibidora de enzimas y los inhibidores conocidos de estas enzimas, lo que explica la existencia de actividad inhibidora.

Palabras claves : *Lavandula dentata*; *Juncus sp.*; *Salicornia europaea*; principios activos farmacológicos; ensayos de exposición; carbamazepina; flumequina; ciprofloxacina; enrofloxacin; ibuprofeno; diclofenaco; Parque Nacional de Doñana; metabolitos; enzimas; inhibición enzimática; tirosinasa; lipoxigenasa; collagenasa; elastasa; antioxidantes.

Determination of drug residues and their metabolites in wild plants.

Uptake assay and evaluation of bioactivity

The presence of pharmaceuticals in environmental waters or plant matrices suppose a challenge for environment preservation, which makes necessary to evaluate, monitor and carry out an environmental diagnosis of the areas affected by pollution in order to know the ecosystems damaged by the presence of pollutants and thus evaluate the consequences of these on living beings. For this reason, this Thesis focuses its study on the effects of pollution on the native flora of the Doñana National Park (Spain), providing qualitative and quantitative data on the effect of pharmacologically active substances (such as emerging contaminants) in three plant species in this area, in addition similar studies are virtually non-existent.

This work aims to increase knowledge about the consequences of anthropogenic pressure in the ecosystem of Doñana National Park, simulating at laboratory scale the presence of pharmaceuticals, their degradation compounds and metabolites, in plant matrices from this natural environment. The antioxidant and enzymatic capacity as well as the identification of inhibitory molecules to the enzymes used in this study were evaluated in a collection of 150 selected plants from Doñana.

An analytical procedure using high resolution liquid chromatography with detection of mass spectrometry - flight time has been optimized and validated for the identification and quantification of six active pharmacological principles, carbamazepine, flumequine, ciprofloxacin, enrofloxacin, ibuprofen and diclofenac, in extracts from three plant species: *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* and *Salicornia europaea*.

An uptake study has been carried out, irrigating the selected plants with aqueous solutions containing variable concentrations of the pharmaceuticals. The samples have been analyzed at 7, 15, 21 and 30 days (end of the assay) and the accumulation of the selected substances have been determined. Additionally, non-targeted analytical techniques using appropriate software (MetabolynxTM) have been applied to data from the samples subjected to the uptake study to identify possible metabolites and degradation products and possible metabolic routes involved.

Additionally, some methods were optimized to evaluate antioxidant and inhibitory activities, using different enzymes (tyrosinase, elastase, collagenase and lipoxygenase), in the extracts of a selection of 150 plants from the Doñana National Park. For this purpose, the specimens were extracting using solvents of different polarity and extracting capacity: hexane, ethanol, water: ethanol (1:1, v/v) and ethyl acetate. These methods were applied to evaluate the enzymatic inhibition capacity as well as antioxidant capacity of the extracts.

Keywords : *Lavandula dentata*; *Juncus sp.*; *Salicornia europaea*; drugs; uptake assay; carbamazepine; flumequine; ciprofloxacin; enrofloxacin; ibuprofen; diclofenac; Doñana National Park; metabolites; enzymes; enzymatic inhibition; tyrosinase; lipoxygenase; collagenase; elastase; antioxidants.



TESIS DOCTORAL EN COTUTELA INTERNACIONAL

THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Por/Par

Sofía Barreales Suárez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FÁRMACOS Y SUS
METABOLITOS EN PLANTAS SILVESTRES. ENSAYOS DE
EXPOSICIÓN Y EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD**

TESIS DOCTORAL

Sofía Barreales Suárez

Sevilla, 2019



UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

(ED SFA 364)

INSTITUT DE CHIMIE DE NICE

MOLÉCULES BIOACTIVES

**DÉTERMINATION DE RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS ET SES
MÉTABOLITES DANS LES PLANTES SAUVAGES. ESSAIS
D'EXPOSITION ET ÉVALUATION DE LA BIOACTIVITÉ**

THÈSE DE DOCTORAT

Sofía Barreales Suárez

Nice, 2019

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FÁRMACOS Y SUS METABOLITOS
EN PLANTAS SILVESTRES. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN Y EVALUACIÓN
DE LA BIOACTIVIDAD**

El Director



Fdo.: D. Miguel Ángel Bello López

Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

El Director



Fdo.: M. Stéphane Azoulay

Maitre de Conférences
Instituto de Química de Niza
Université Côte d'Azur

La Directora


Fdo.: Dña. Rut María Fernández Torres

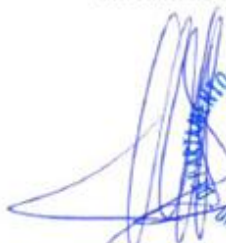
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Memoria presentada por Sofia Barreales Suárez para optar al título de Doctora en Química con
Mención Internacional por la Universidad de Sevilla y al título de Doctora en Química con
Mención Internacional por la Université Côte d'Azur.


Fdo.: Sofia Barreales Suárez
Graduada en Química

**DÉTERMINATION DE RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS ET SES
MÉTABOLITES DANS LES PLANTES SAUVAGES. ESSAIS D'EXPOSITION
ET ÉVALUATION DE LA BIOACTIVITÉ**

Le Directeur



Signature : M. Miguel Ángel Bello López

Professeur d'Université
Département de Chimie Analytique
Universidad de Sevilla

Le Directeur



Signature : M. Stéphane Azoulay

Maître de Conférences
Institut de Chimie de Nice
Université Côte d'Azur

Co-encadrante



Signature : Mme Rut María Fernández Torres

Maître de Conférences
Département de Chimie Analytique
Universidad de Sevilla

Mémoire présentée par Sofia Barreales Suárez d'opter pour le titre de Docteur en Chimie avec
Mention Internationale de l'Université de Séville et pour le titre de Docteur en Chimie avec
Mention Internationale de l'Université Côte d'Azur.



Signature : Sofia Barreales Suárez

Graduada en Chimie

D. FERNANDO DE PABLOS PONS, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado **“Determinación de residuos de fármacos y sus metabolitos en plantas silvestres. Ensayos de exposición y evaluación de la bioactividad”**, que constituye la memoria presentada por Sofia Barreales Suárez para aspirar al grado de Doctora en Química con Mención Internacional, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Miguel Ángel Bello López y Rut María Fernández Torres, profesores de este departamento, reuniendo a mi juicio las condiciones exigidas para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 19 de julio de 2019.

A circular blue ink stamp from the Department of Analytical Chemistry (Departamento de Química Analítica) of the University of Seville (Universidad de Sevilla). The stamp features a central emblem and is surrounded by the department's name. A handwritten signature in blue ink, which appears to be 'F. de Pablo S.', is written across the right side of the stamp.

Fdo.: D. Fernando de Pablos Pons

Mme. MARIA DUCA, CHEF DU GROUPE TARGETING OF NUCLEIC ACIDS,
APPARTENANT À L'ÉQUIPE DES MOLÉCULES BIOACTIVES DE L'INSTITUT DE
CHIMIE DE NICE, DE L'UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR.

CERTIFIES: Que le présent travail de recherche intitulé "**Détermination de résidus de médicaments et ses métabolites dans les plantes sauvages. Essais d'exposition et évaluation de la bioactivité**", qui constitue la mémoire présentée par Sofía Barreales Suárez pour aspirer au titre de Docteur en Chimie avec Mention Internationale de Cotutelle, a été réalisée dans les laboratoires du Institut de Chimie de Nice, de l'Université de Côte d'Azur, sous la direction de M. Stéphane Azoulay, maître de conférences à l'Institut de Chimie de Nice, remplissant selon moi les conditions requises pour ce type de travail.

Je délivre et signe ce certificat à Nice le 19 juillet 2019.

Signé: Mme. Maria Duca



A mis padres y a mi hermano

AGRADECIMIENTOS / REMERCIEMENTS

En primer lugar quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a los directores de este trabajo Dra. Dña. Rut M^a Fernández Torres y Dr. D. Miguel Ángel Bello López por abrirme las puertas de su grupo de investigación y depositar en mí la confianza para la realización de este proyecto de investigación. À Dr. M. Stéphane Azoulay, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse en cotutelle et m'avoir fait confiance pendant toutes ces années dans la réalisation des différents projets de recherche. Gracias a los tres por ser la guía en este trabajo, por toda la atención, tiempo dedicado y ayuda prestada en la realización de esta Tesis. Por todos los conocimientos y consejos que me habéis enseñado a lo largo de estos años, por el entusiasmo y el trato personal recibí. Gracias de corazón. Merci à vous trois d'avoir été le guide dans ce travail, pour toute l'attention, le temps consacré et l'aide apportée dans la réalisation de cette thèse. Pour toutes les connaissances et les conseils que vous m'avez enseignés au fil des ans, pour l'enthousiasme et le traitement personnel que j'ai reçus. Merci du fond du cœur.

Al director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, D. Fernando de Pablos Pons por proporcionarme los medios precisos realizar este trabajo de investigación.

À l'Institut de Chimie de Nice (CNRS UMR 7272) principalement à l'équipe des Molécules Bioactives, en particulier à Dr. Mme. Maria Duca, directrice du groupe Targeting of Nucleic Acids pour faire partie de leur équipe.

A la Universidad de Sevilla, por la ayuda concedida para la realización de esta Tesis Doctoral, a través de su plan de ayuda de Tesis en Cotutela y sus programas de intercambio con centros de investigación extranjeros. También quisiera agradecer a Dña. Ana M^a Moreno Barea de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Sevilla, por toda la ayuda prestada en los trámites del convenio de cotutela de tesis.

À l'Université Côte d'Azur, pour avoir facilité la réalisation de cette thèse en co-tutelle, en particulier à Mme. Taffin de Givenchy de l'École Doctorale Sciences Fondamentales et Appliquées (ED SFA 364) pour toute son aide et son temps consacré à la gestion de la convention de cotutelle.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión del proyecto en el que se ha realizado esta Tesis: CTM2015-67902-C2-1-P y a los fondos FEDER Project UNSE10-1E-429.

Al Servicio de Microanálisis de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS, Celestino Mutis) por el uso de sus instalaciones y equipos.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla a través de las ayudas del VI Plan Propio de Investigación para el uso de los Servicios Generales de Investigación, así como al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del proyecto PGC2018-096608-B-C22.

A todos mis compañeros del grupo de investigación de química analítica de la Universidad de Sevilla, especialmente a Ana, como a los del grupo de moléculas bioactivas de la Université Côte d'Azur y a todos los componentes de ambos grupos de investigación por su enorme disposición siempre que lo he necesitado y por todos los buenos momentos compartidos juntos.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues de l'équipe de recherche en chimie analytique de l'Université de Séville ainsi qu'à ceux du groupe de molécules bioactives de l'Université Côte d'Azur et à toutes les composantes des deux équipes de recherche pour leur disponibilité énorme chaque fois que j'en ai eu besoin et pour tous les bons moments partagés ensemble.

Je remercie le Pr. M. Xavier Fernandez et Dr. M. Thomas Michel de l'équipe Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale de l'Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'Azur, pour m'avoir permis de collaborer avec leur équipe, notamment M. Thomas Michel pour son aide en analyse végétale.

Quiero agradecer también a D. Miguel Salazar de Agro-On (Faro, Portugal) por su inmensa amabilidad en facilitarnos las plantas de *Salicornia europaea* para la realización de distintos ensayos.

Al profesor D. Felipe García Martín del departamento de biología vegetal y ecología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, por su ayuda y tiempo empleado para la identificación de las plantas de esta Tesis.

A mi familia y a mis amigos de Sevilla, Niza y Madrid por estar siguiendo tanto en el día a día como en la distancia, todos los avances de esta Tesis, a Blanca, Diego, Julia S., Carmen R., Inés, María G., Anna, Marcos, Inma, Cristinita, Sara, Paola, Marta, Fátima y todos los demás por todo lo vivido durante estos años.

Por último y lo más importante, agradecer especialmente a mis padres y a mi hermano por todo el apoyo y los ánimos recibidos.

A todos, muchísimas gracias

Merci à tous!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	33
ÍNDICE DE FIGURAS.....	35
OBJETIVOS.....	49
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	57
1. La contaminación ambiental y su diagnóstico.....	61
1.1. Los contaminantes emergentes.....	63
1.2. Los fármacos.....	66
1.3. Problemática de los fármacos en el medioambiente.....	69
1.4. Características de los principios activos estudiados.....	72
1.4.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	72
1.4.1.1. Diclofenaco.....	74
1.4.1.2. Ibuprofeno.....	75
1.4.2. Antiepilépticos.....	75
1.4.2.1. Carbamazepina.....	75
1.4.3. Fluoroquinolonas.....	76
1.4.3.1. Ciprofloxacina.....	78
1.4.3.2. Enrofloxacin.....	78
1.4.3.3. Flumequina.....	79
2. Metabolismo en plantas.....	81
3. Procesos de biorremediación.....	84
4. Bioindicadores de contaminación.....	87
4.1. <i>Lavandula dentata</i>	88
4.2. <i>Juncus sp</i>	89
4.3. <i>Salicornia europaea</i>	90
5. Parque Nacional de Doñana.....	92
5.1. Doñana: Enclave natural.....	92
5.2. Ecosistemas del Parque Nacional de Doñana.....	93
5.3. Contaminación en el Parque Nacional de Doñana.....	97
6. Espectrometría de masas.....	99
7. Enzimas: estructura y modo de acción.....	105
7.1. Cofactores.....	108
8. Inhibidores enzimáticos.....	108
8.1. Tipos de inhibidores reversibles.....	109
9. Enzima colagenasa.....	110

9.1. Estructura de la enzima colagenasa: sitio activo.....	111
9.2. Inhibidores de la enzima colagenasa.....	112
10. Enzima tirosinasa.....	112
10.1. Estructura de la enzima tirosinasa: sitio activo.....	113
10.2. Inhibidores de la enzima tirosinasa.....	114
11. Enzima elastasa.....	116
11.1. Estructura de la enzima elastasa: sitio activo.....	116
11.2. Inhibidores de la enzima lipoxigenasa.....	117
12. Enzima lipoxigenasa.....	117
12.1. Estructura de la enzima lipoxigenasa: sitio activo.....	119
12.2. Inhibidores de la enzima lipoxigenasa	120
13. Antioxidantes.....	120
13.1. DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.....	122
13.2. Polifenoles y flavonoides.....	123
 CAPÍTULO II: MATERIALES Y REACTIVOS.....	 193
1. Materiales y reactivos.....	195
1.1. Reactivos.....	195
1.2. Material.....	196
1.3. Instrumentación.....	198
2. Disoluciones.....	199
2.1. Disoluciones patrón.....	199
2.2. Disoluciones para tests enzimáticos.....	199
2.2.1. Disoluciones test enzimático: enzima colagenasa.....	199
2.2.2. Disoluciones test enzimático: enzima tirosinasa.....	200
2.2.3. Disoluciones test enzimático: enzima elastasa.....	201
2.2.4. Disoluciones test enzimático: enzima lipoxigenasa.....	201
2.3. Disoluciones tests antioxidantes.....	202
2.3.1. Flavonoides.....	202
2.3.2. Polifenoles.....	202
2.2.3. DPPH.....	203
 CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL.....	 217
1. Procedimientos experimentales.....	221
1.1. Optimización de la separación cromatográfica.....	221

1.1.1. Elección de la columna cromatográfica.....	221
1.2. Condiciones de detección mediante espectrometría de masas.....	223
2. Preparación de muestras de matrices vegetales.....	227
2.1. Optimización del tratamiento de extracción.....	227
2.2. Validación de la metodología planteada.....	230
2.2.1. Linealidad.....	231
2.2.2. Sensibilidad: límites de detección y cuantificación.....	231
2.2.3. Precisión.....	232
2.2.4. Evaluación del efecto matriz.....	234
2.2.5. Exactitud: ensayos de recuperación.....	235
3. Ensayos de exposición.....	238
3.1. Ensayo de exposición: <i>Lavandula dentata</i>	238
3.2. Ensayo de exposición: <i>Juncus sp.</i>	239
3.3. Ensayo de exposición: <i>Salicornia europaea</i>	240
4. Determinación del contenido de nitrógeno en los sustratos.....	244
5. Identificación de metabolitos: MetaboLynx.....	244
6. Procedimiento de extracción de muestras para ensayos enzimáticos.....	246
7. Optimización de las condiciones enzimáticas para ensayo de tirosinasa....	246
8. Procedimientos ensayos enzimáticos.....	249
8.1. Enzima colagenasa.....	249
8.2. Enzima tirosinasa.....	250
8.3. Enzima elastasa.....	251
8.4. Enzima lipoxigenasa.....	252
9. Optimización de los test antioxidantes.....	253
9.1. Polifenoles.....	253
9.2. Flavonoides.....	254
10. Procedimientos ensayos antioxidantes.....	255
10.1. Flavonoides.....	255
10.2. Polifenoles.....	256
10.3. DPPH.....	257
11. Tratamiento de datos.....	258
 CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 303
1. Humedad.....	307
2. Ensayos de exposición: resultados de acumulación de fármacos.....	307
2.1. <i>Lavandula dentata</i>	307

2.2. <i>Juncus sp.</i>	312
2.3. <i>Salicornia europaea</i>	316
3. Contenido de nitrógeno en las muestras de sustrato.....	318
4. Posibles metabolitos detectados en las plantas ensayadas.....	319
4.1. Carbamazepina en <i>Lavandula dentata</i>	320
4.2. Flumequina en <i>Lavandula dentata</i>	322
4.3. Ciprofloxacina en <i>Lavandula dentata</i>	325
4.4. Enrofloxacin en <i>Lavandula dentata</i>	327
4.5. Diclofenaco en <i>Lavandula dentata</i>	329
4.6. Ibuprofeno en <i>Lavandula dentata</i>	331
4.7. Carbamazepina en <i>Juncus sp.</i>	332
4.8. Flumequina en <i>Juncus sp.</i>	335
4.9. Ciprofloxacina en <i>Juncus sp.</i>	336
4.10. Enrofloxacin en <i>Juncus sp.</i>	339
4.11. Diclofenaco en <i>Juncus sp.</i>	341
4.12. Ibuprofeno en <i>Juncus sp.</i>	344
4.13. Carbamazepina en <i>Salicornia europaea</i>	344
4.14. Flumequina en <i>Salicornia europaea</i>	346
4.15. Ciprofloxacina en <i>Salicornia europaea</i>	348
4.16. Enrofloxacin en <i>Salicornia europaea</i>	351
4.17. Diclofenaco en <i>Salicornia europaea</i>	353
4.18. Ibuprofeno en <i>Salicornia europaea</i>	356
5. Resultados ensayos enzimáticos.....	358
5.1. Análisis de fracciones mediante cromatografía líquida de alta resolución en HPLC.....	361
5.2. Análisis de ensayos antioxidantes.....	373
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	445
BIBLIOGRAFÍA.....	453
ANEXO I.....	477
ANEXO II.....	515
ANEXO III.....	523
ANEXO IV.....	573

ÍNDICE DE TALBAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos seleccionados.....	80
Tabla 2. Condiciones óptimas de separación cromatográfica para la determinación de los principios activos.....	222
Tabla 3. Condiciones óptimas de detección de masas.....	225
Tabla 4. Tiempo de retención, composición elemental de los iones en full MS y MS/MS y energía de colisión óptima para cada analito.....	226
Tabla 5. Evaluación de la cantidad de muestra.....	228
Tabla 6. Evaluación de la mezcla extractante.....	229
Tabla 7. Evaluación de la preconcentración del extracto con distintos disolventes.....	229
Tabla 8. Límites de detección y cuantificación instrumentales (ILOD e ILOQ) y los correspondientes del método en cada matriz vegetal.....	233
Tabla 9. Recuperaciones obtenidas para FMQ, CBZ y CPR en las diferentes matrices vegetales.....	237
Tabla 10. Recuperaciones obtenidas para ENR, DCL e IBU en las diferentes matrices vegetales.....	237
Tabla 11. Rutas metabólicas e incrementos de masas de los metabolitos esperados.....	245
Tabla 12. Resultados para CBZ y FMQ del ensayo de exposición de <i>Lavandula dentata</i>	310
Tabla 13. Resultados de acumulación de CBZ, FMQ y CPR del ensayo de exposición de <i>Juncus sp.</i>	314
Tabla 14. Resultados de acumulación de ENR y DCL del ensayo de exposición de <i>Juncus sp.</i>	315
Tabla 15. Resultados de acumulación de CBZ y FMQ del ensayo de exposición de <i>Salicornia eu</i>	317
Tabla 16. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los distintos sustratos de las matrices vegetales.....	318
Tabla 17. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina.....	322
Tabla 18. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con flumequina.....	324
Tabla 19. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con ciprofloxacina.....	326
Tabla 20. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacin.....	328

Tabla 21. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco.....	330
Tabla 22. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Lavandula dentata</i> sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno.....	332
Tabla 23. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina.....	334
Tabla 24. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con flumequina.....	336
Tabla 25. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con ciproflaxacina.....	338
Tabla 26. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacina.....	340
Tabla 27. Posibles metabolitos encontrados en muestras de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco.....	343
Tabla 28. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Juncus sp.</i> sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno.....	344
Tabla 29. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina.....	346
Tabla 30. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con flumequina.....	348
Tabla 31. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con ciprofloxacina.....	350
Tabla 32. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacina.....	352
Tabla 33. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco.....	355
Tabla 34. Posibles metabolitos encontrados en plantas de <i>Salicornia eu.</i> sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno.....	357
Tabla 35. Separación y condiciones cromatográficas empleadas en el análisis en HPLC de las fracciones.....	362
Tabla 36. Separación y condiciones cromatográficas empleadas en el análisis UHPLC-Q-TOF-MS.....	363
Tabla 37. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 46 EtOH.....	368
Tabla 38. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 46 AcEt.....	370
Tabla 39. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 78 EtOH.....	372

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas simplificadas de entrada de productos farmacéuticos al medio ambiente.....	66
Figura 2. Reacciones de transformación de compuestos farmacológicos en el organismo.....	68
Figura 3. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.....	73
Figura 4. Elementos básicos del metabolismo de plantas.....	81
Figura 5. Célula vegetal.....	83
Figura 6. <i>Lavandula dentata</i>	89
Figura 7. <i>Juncus sp.</i>	90
Figura 8. <i>Salicornia europaea</i>	91
Figura 9. Localización del Parque Nacional de Doñana.....	92
Figura 10. Corte del territorio: playa, dunas y corrales.....	94
Figura 11. Corte del territorio: marisma, vera, cotos y grandes pinares.....	94
Figura 12. Lucio del membrillo.....	95
Figura 13. Cotos de Doñana.....	96
Figura 14. Dunas de Doñana.....	97
Figura 15. Analizador de trampa de iones.....	101
Figura 16. Analizador de cuadrupolo.....	103
Figura 17. Analizador de tiempo de vuelo.....	103
Figura 18. Formación del complejo enzima-sustrato.....	106
Figura 19. Reacción de inhibición competitiva.....	109
Figura 20. Reacción de inhibición no competitiva.....	110
Figura 21. Estructura de dominio de MMP.....	112
Figura 22. Coordinación del sitio activo de la enzima tirosinasa.....	114
Figura 23. Estructura de la enzima tirosinasa	114
Figura 24. Reacción simplificada para la formación de melanina.....	114
Figura 25. Sitio activo de la enzima elastasa	116
Figura 26. Vías metabólicas simplificadas del ácido araquidónico.....	119
Figura 27. Estructura de la lipoxigenasa (LOX-1) de soja.....	120
Figura 28. Gráfico de cambio de coloración del DPPH de violeta a amarillo cuando está expuesta a una sustancia oxidante.....	122
Figura 29. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	124

Figura 30. Esquema de optimización del procedimiento de extracción de los analitos seleccionados en las matrices vegetales.....	228
Figura 31. Procedimiento de extracción optimizado para la extracción de los analitos seleccionados en las matrices.....	230
Figura 32. Representación gráfica de los porcentajes del efecto matriz (ME) en las diferentes matrices vegetales estudiadas.....	235
Figura 33. Esquema del ensayo de exposición de <i>Lavándula dentata</i>	238
Figura 34. Cromatogramas de iones totales (TIC) y extraídos de una muestra de tallo de <i>Juncus sp.</i> con todos los analitos a 25 ng·g ⁻¹ . a) Diclofenaco-; b) Enrofloxacin+; c) Ciprofloxacina+; d) Flumequina+; e) Carbamazepina+; f) Diclofenaco+; g) ibuprofeno-; h) Cromatograma de iones totales de ionización negativa; i) Cromatograma de iones totales para la ionización positiva.....	242
Figura 35. Espectros de masa de una muestra de tallo de <i>Juncus sp.</i> con todos los analitos a 25 ng·g ⁻¹ . a) Ibuprofeno-b) Diclofenaco-; c) Diclofenaco+; d) Flumequina+; e) Carbamazepina+; f) Enrofloxacin+; g) Ciprofloxacina+.....	243
Figura 36. Actividad enzimática de la tirosinasa en función del pH.....	247
Figura 37. Actividad enzimática de la tirosinasa en función de la concentración de enzima.....	248
Figura 38. Actividad enzimática de la tirosinasa en función de la concentración de sustrato.....	248
Figura 39. Progreso de la reacción enzimática del ácido kójico con la tirosinasa en función de su concentración, empleando como sustrato L-Tirosina.....	249
Figura 40. Plan de placa de la enzima colagenasa y la enzima tirosinasa.....	251
Figura 41. Plan de placa de la enzima elastasa y la enzima lipoxigenasa.....	252
Figura 42. Ejemplo de placa para la determinación de polifenoles.....	253
Figura 43. Fórmula estructural quercetina y sus bandas de absorción.....	254
Figura 44. Fórmula estructural catequina.....	254
Figura 45. Ejemplo de placa para la determinación de flavonoides.....	255
Figura 46. Plan de placa de flavonoides.....	256
Figura 47. Plan de placa de polifenoles.....	257
Figura 48. Plan de placa de DPPH.....	258
Figura 49. Planta nº 46 <i>Hemerocallis</i>	361
Figura 50. Planta nº 78 <i>Lycianthes rantonnetii</i>	361
Figura 51. Cromatograma de iones totales obtenidos a partir de la planta <i>Hemerocallis</i> extraída con EtOH.....	367

Figura 52. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 46 EtOH.....	367
Figura 53. Cromatograma de iones totales extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 46 EtOH.....	367
Figura 54. Espectro obtenido del posible metabolito de hidroxilación de la muestra 46 EtOH con un tiempo de retención de 6.58 minutos.....	368
Figura 55. Espectro obtenido de la muestra 46 EtOH a tiempo de retención de 4.78 minutos.....	368
Figura 56. Cromatograma de iones totales obtenido a partir de la planta <i>Hemerocallis</i> extraída con AcEt.....	369
Figura 57. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 46 AcEt.....	369
Figura 58. Espectro obtenido de la muestra 46 AcEt a tiempo de retención de 4.96 minutos.....	370
Figura 59. Espectro obtenido a tiempo de retención 13.76 minutos.....	370
Figura 60. Cromatograma iones totales obtenido a partir de la planta <i>Lycianthes rantonnetii</i> extraída con EtOH.....	371
Figura 61. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 78 EtOH.....	371
Figura 62. Espectro obtenido a un tiempo de retención de 11.87 minutos.....	372
Figura 63. Espectro obtenido a tiempo de retención 12.41 minutos.....	372

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	43
LISTE DES FIGURES.....	45
OBJECTIFS.....	53
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	125
1. La contamination environnementale et son diagnostic.....	129
1.1. Polluants émergents.....	131
1.2. Les produits pharmaceutiques.....	134
1.3. Le problème des produits pharmaceutiques dans l'environnement.....	137
1.4. Caractéristiques des substances actives étudiées.....	139
1.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdens.....	139
1.4.1.1. Diclofénac.....	142
1.4.1.2. Ibuprofène.....	142
1.4.2. Antiépileptiques.....	143
1.4.1.2. Carbamazépine.....	143
1.4.3. Fluoroquinolones.....	144
1.4.3.1. Ciprofloxacine.....	145
1.4.3.2. Enrofloxacin.....	146
1.4.3.3. Fluméquine.....	146
2. Métabolisme des végétaux.....	149
3. Procédés de biorestauration.....	152
4. Bio-indicateurs de contamination.....	155
4.1. <i>Lavandula dentata</i>	156
4.2. <i>Juncus sp</i>	157
4.3. <i>Salicornia europaea</i>	158
5. Parc National de Doñana.....	160
5.1. Doñana: enclave naturelle.....	160
5.2. Écosystèmes du Parc National de Doñana.....	161
5.3. Pollution dans le Parc National de Doñana.....	165
6. Spectrométrie de masse.....	167
7. Enzymes: structure et mode d'action.....	173
7.1. Cofacteurs.....	176
8. Inhibiteurs enzymatiques.....	176
8.1. Types d'inhibiteurs réversibles.....	177

9. Enzyme collagénase.....	179
9.1. Structure de l'enzyme collagénase: site actif.....	180
9.2. Inhibiteurs de l'enzyme collagénase	181
10. Enzyme tyrosinase.....	181
10.1. Structure de l'enzyme tyrosinase: site actif.....	182
10.2. Inhibiteurs de l'enzyme tyrosinase.....	183
11. Enzyme élastase.....	184
11.1. Structure de l'enzyme élastase: site actif.....	184
11.2. Inhibiteurs de l'enzyme élastase	185
12. Enzyme lipoxigénase.....	186
12.1. Structure de l'enzyme lipoxigénase: site actif.....	187
12.2. Inhibiteurs de l'enzyme lipoxigénase.....	188
13. Antioxydants.....	189
13.1. DPPH: 2,2-diphenyle-1-picryl hydrazyl.....	190
13.2. Polyphénols et flavonoïdes.....	191
 CHAPITRE II: MATERIELS ET RÉACTIFS.....	 205
1. Matériels et réactifs.....	207
1.1. Réactifs.....	207
1.2. Matériel.....	208
1.3. Instrumentation.....	210
2. Dissolutions.....	211
2.1. Solutions étalons.....	211
2.2. Solutions pour les tests enzymatiques.....	211
2.2.1. Solutions de test enzymatique: enzyme collagénase.....	211
2.2.2. Solutions de test enzymatique: enzyme tyrosinase.....	212
2.2.3. Solutions de test enzymatique: enzyme élatase.....	213
2.2.4. Solutions de test enzymatique: enzyme lipoxigénase.....	213
2.3. Solutions des tests antioxydants.....	214
2.3.1. Flavonoïdes.....	214
2.3.2. Polyphénols.....	214
2.3.3. DPPH.....	215
 CHAPITRE III: PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	 259
1. Procédures expérimentales.....	263
1.1. Optimisation de la séparation chromatographique.....	263

1.1.1. Choix de la colonne chromatographique.....	263
1.2. Conditions de détection par spectrométrie de masse.....	265
2. Préparation d'échantillons de matrices végétales.....	269
2.1. Optimisation du traitement d'extraction.....	269
2.2. Validation de la méthodologie proposée.....	272
2.2.1. Linéarité.....	273
2.2.2. Sensibilité: limites de détection et quantification.....	273
2.2.3. La précision.....	274
2.2.4. Évaluation de l'effet de matrice.....	276
2.2.5. Précision: tests de récupération.....	277
3. Essais d'exposition.....	280
3.1. Essais d'exposition: <i>Lavandula dentata</i>	280
3.2. Essais d'exposition: <i>Juncus sp.</i>	281
3.3. Essais d'exposition: <i>Salicornia europaea</i>	282
4. Détermination de la teneur en azote des substrats.....	286
5. Obtention de métabolites.....	286
6. Extraction des plantes pour tests enzymatique.....	288
7. Optimisation des conditions enzymatiques pour le test de la tyrosinase.....	288
8. Protocoles pour les tests enzymatiques.....	292
8.1. Enzyme collagénase	292
8.2. Enzyme tyrosinase.....	293
8.3. Enzyme elastase.....	294
8.4. Enzyme lipoxygénase.....	294
9. Optimisation des tests antioxydants.....	296
9.1. Polyphénols.....	296
9.2. Flavonoïdes.....	297
10. Protocoles pour les tests d'antioxydants.....	298
10.1. Flavonoïdes.....	298
10.2. Polyphénols.....	299
10.3. DPPH.....	300
11. Traitement des données.....	301
 CHAPITRE IV: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	 375
1. L'humidité.....	379
2. Tests d'exposition: les résultats de l'accumulation des médicaments.....	379
2.1. <i>Lavandula dentata</i>	379

2.2. <i>Juncus sp</i>	384
2.3. <i>Salicornia europaea</i>	388
3. Contenu d'azote dans les échantillons de terreau.....	390
4. Possibles métabolites détectés dans les plantes testées.....	391
4.1. Carbamazépine dans <i>Lavandula dentata</i>	392
4.2. Fluméquine dans <i>Lavandula dentata</i>	394
4.3. Ciprofloxacine dans <i>Lavandula dentata</i>	396
4.4. Enrofloxacin dans <i>Lavandula dentata</i>	398
4.5. Diclofénac dans <i>Lavandula dentata</i>	400
4.6. Ibuprofène dans <i>Lavandula dentata</i>	402
4.7. Carbamazépine dans <i>Juncus sp</i>	403
4.8. Fluméquine dans <i>Juncus sp</i>	406
4.9. Ciprofloxacine dans <i>Juncus sp</i>	407
4.10. Enrofloxacin dans <i>Juncus sp</i>	410
4.11. Diclofénac dans <i>Juncus sp</i>	412
4.12. Ibuprofène dans <i>Juncus sp</i>	415
4.13. Carbamazépine dans <i>Salicornia eu</i>	415
4.14. Fluméquine dans <i>Salicornia eu</i>	417
4.15. Ciprofloxacine dans <i>Salicornia eu</i>	419
4.16. Enrofloxacin dans <i>Salicornia eu</i>	421
4.17. Diclofénac dans <i>Salicornia eu</i>	423
4.18. Ibuprofène dans <i>Salicornia eu</i>	426
5. Résultats d'analyse enzymatique.....	428
5.1. Analyse des fractions par chromatographie liquide à haute résolution en HPLC.....	431
5.2. Résultats des essais antioxydants.....	442
CHAPITRE V: CONCLUSIONS.....	449
BIBLIOGRAPHIE.....	453
ANNEXE I.....	477
ANNEXE II.....	515
ANNEXE III.....	523
ANNEXE IV.....	573

LISTE DES TBLEAUX

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des composés pharmaceutiques.....	148
Tableau 2. Conditions de séparation chromatographique optimales pour la détermination des principes actifs.....	264
Tableau 3. Conditions optimales de détection de masse.....	267
Tableau 4. Temps de rétention, composition élémentaire des ions dans la MS et la MS/MS et énergie de collision optimale pour chaque analyte.....	268
Tableau 5. Évaluation de la quantité d'échantillons.....	270
Tableau 6. Évaluation du mélange d'agent d'extraction.....	271
Tableau 7. Evaluation de la pré-concentration de l'extrait avec différents solvants..	271
Tableau 8. Limites instrumentales de détection et de quantification (ILOD et ILOQ) et méthode correspondante dans chaque matrice végétale.....	275
Tableau 9. Récupération obtenue pour FMQ, CBZ et CPR dans les différentes matrices végétales.....	279
Tableau 10. Récupération obtenue pour ENR, DCL et IBU dans les différentes matrices végétales.....	279
Tableau 11. Voies métaboliques et augmentation massive des métabolites attendus.....	287
Tableau 12. Résultats pour CBZ et FMQ d'essais d'exposition de <i>Lavandula</i> <i>dentata</i>	382
Tableau 13. Résultats de l'accumulation de CBZ, FMQ et CPR du test d'exposition de <i>Juncus sp.</i>	386
Tableau 14. Résultats d'accumulation de l'ENR et du DCL de l'essai d'exposition de <i>Juncus sp.</i>	387
Tableau 15. Résultats d'accumulation de CBZ et FMQ de l'essai d'exposition de <i>Salicornia eu.</i>	389
Tableau 16. Pourcentage d'azote obtenu dans les différents substrats des matrices végétales.....	390
Tableau 17. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec la carbamezépine.....	393
Tableau 18. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec la fluméquine.....	395
Tableau 19. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec la ciprofloxacine.....	397

Tableau 20. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec l'enrofloxaciné.....	397
Tableau 21. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec le diclofénaé.....	399
Tableau 22. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Lavandula dentata</i> soumises à des tests d'exposition avec l'ibuproféne.....	401
Tableau 23. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec la carbamazépine.....	403
Tableau 24. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec la fluméquine.....	405
Tableau 25. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec la ciproflaxaciné.....	407
Tableau 26. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec l'enrofloxaciné.....	411
Tableau 27. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec le diclofénaé.....	414
Tableau 28. Possibles métabolites trouvés dans les plantes <i>Juncus sp.</i> soumis à des tests d'exposition avec l'ibuproféne.....	415
Tableau 29. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec la carbamazépine.....	417
Tableau 30. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec la fluméquine.....	418
Tableau 31. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec la ciproflaxaciné.....	420
Tableau 32. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec l'enrofloxaciné.....	422
Tableau 33. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec le diclofénaé.....	425
Tableau 34. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de <i>Salicornia europaea</i> soumis à des tests d'exposition avec l'ibuproféne.....	427
Tableau 35. Séparation et conditions chromatographiques utilisées dans l'analyse HPLC des fractions.....	432
Tableau 36. Séparation et conditions chromatographiques utilisées dans l'analyse UHPLC-Q-TOF-MS.....	433
Tableau 37. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 46 EtOH.....	437
Tableau 38. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 46 AcEt.....	439
Tableau 39. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 78 EtOH.....	441

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voies simplifiées d'entrée de produits pharmaceutiques à l'environnement.....	134
Figure 2. Réactions de transformation de composés pharmacologiques dans l'organisme.....	136
Figure 3. Synthèse d'eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique.....	141
Figure 4. Éléments du métabolisme des plantes.....	149
Figure 5. Cellule végétale.....	151
Figure 6. <i>Lavandula dentata</i>	157
Figure 7. <i>Juncus sp.</i>	158
Figure 8. <i>Salicornia europaea</i>	159
Figure 9. Emplacement du Parc National de Doñana.....	160
Figure 10. Cour du territoire: Plage et dunes.....	162
Figure 11. Cour du territoire: Marais, vera et forêt de pins.....	162
Figure 12. « Brochet du Coing ».....	163
Figure 13. Réserves de Doñana.....	164
Figure 14. Dunes de Doñana.....	165
Figure 15. Analyseur de pièges à ions.....	169
Figure 16. Analyseur quadripolaire.....	171
Figure 17. Analyseur temps de vol.....	171
Figure 18. Formation du complexe enzyme-substrat.....	174
Figure 19. Inhibition compétitive.....	178
Figure 20. Inhibition non compétitive.....	178
Figure 21. Structure du domaine MMP	180
Figure 22. Coordination du site actif des atomes de Cu^{+2}	182
Figure 23. Structure de l'enzyme tyrosinase.....	182
Figure 24. Réaction simplifiée pour la formation de mélanine	182
Figure 25. Site actif de l'enzyme élastase.....	184
Figure 26. Simplification des voies métaboliques de l'acide arachidonique.....	186
Figure 27. Structure de la lipoxigénase (LOX-1) de soja	187
Figure 28. Graphique de changement de couleur du DPPH du violet au jaune lorsqu'il est exposé à une substance oxydante.....	190
Figure 29. Réaction de transfert d'électrons avec le réactif Folin-Ciocalteu.....	191

Figure 30. Schéma d'optimisation pour la procédure d'extraction des analytes sélectionnés dans les matrices de l'installation.....	270
Figure 31. Procédé d'extraction optimisé pour l'extraction des analytes sélectionnés dans les matrices végétales.....	272
Figure 32. Représentation graphique des pourcentages de l'effet de matrice (ME) dans les différentes matrices végétales étudiées.....	277
Figure 33. Schéma du test d'exposition avec <i>Lavandula dentata</i>	280
Figure 34. Chromatogrammes ioniques totaux (TIC) et extraits d'un échantillon de tige <i>Juncus sp.</i> avec tous les analytes à 25 ng·g ⁻¹ : a) Diclofénac- ; b) Enrofloxacin+ ; c) Ciprofloxacine+ ; d) Fluméquine+ ; e) Carbamazépine+ ; f) Diclofénac+ ; g) Ibuprofén- ; h) Chromatogramme négatif d'ionisation totale ; i) chromatogramme négatif d'ionisation totale ; j) chromatogramme positif d'ionisation totale.....	284
Figure 35. Spectre de masse d'un échantillon de tige <i>Juncus sp.</i> avec tous les analytes à 25 ng·g ⁻¹ : a) Ibuprofén- ; b) Diclofénac- ; c) Diclofénac+ ; d) Fluméquine+ ; e) Carbamazépine+ ; f) Enrofloxacin+ ; g) Ciprofloxacine+.....	285
Figure 36. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction du pH.....	289
Figure 37. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction de la concentration enzymatique.....	290
Figure 38. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction de la concentration du substrat.....	291
Figure 39. Progrès de la réaction enzymatique de l'acide kojico avec la tyrosinase en fonction de sa concentration, en utilisant la L-Tyrosine comme substrat.....	291
Figure 40. Plan de la plaque de l'enzyme collagénase et de l'enzyme tyrosinase.....	294
Figure 41. Plan de la plaque de l'enzyme élastase et de l'enzyme lipoxygénase.....	295
Figure 42. Exemple d'une plaque pour la détermination des polyphénols.....	296
Figure 43. Formule structural quercetina y sus bandas de absorción.....	297
Figure 44. Formule structural catequina.....	297
Figure 45. Exemple de plaque de flavonoïde.....	298
Figure 46. Plan de plaque des flavonoïdes.....	299
Figure 47. Plan de plaque des polyphénols.....	300
Figure 48. Plan de plaque de DPPH.....	301
Figure 49. Plante n° 46 <i>Hemerocallis</i>	431
Figure 50. Plante n° 78 <i>Lycianthes rantonnetii</i>	431

Figure 51. Chromatogramme ionique total obtenu à partir de la plante <i>Hemerocallis</i> extraite avec EtOH.....	436
Figure 52. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z quercétine dans l'échantillon 46 EtOH.....	436
Figure 53. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z du possible métabolite obtenu par hydroxylation dans l'extrait 46 EtOH.....	436
Figure 54. Spectre obtenu à partir du possible métabolite de l'hydroxylation de l'échantillon 46 EtOH avec un temps de rétention de 6.58 minutes.....	437
Figure 55. Spectre obtenu à partir de l'échantillon de 46 EtOH avec un temps de rétention de 4.78 minutes.....	437
Figure 56. Chromatogramme ionique total obtenu à partir de la plante <i>Hemerocallis</i> extraite avec AcEt.....	438
Figure 57. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z de quercétine dans l'échantillon 46 AcEt.....	438
Figure 58. Spectre obtenu de l'échantillon de 46 AcEt à temps de rétention de 4.96 minutes.....	439
Figure 59. Spectre obtenu à temps de rétention de 13.76 minutes.....	439
Figure 60. Chromatogramme obtenu à partir de la plante <i>Lycianthes rantonnetii</i> extraite avec EtOH.....	440
Figure 61. Chromatogramme obtenu à partir des pics contenant la masse de quercétine de l'échantillon 78 EtOH.....	440
Figure 62. Spectre obtenu à un temps de rétention de 11.87 minutes.....	441
Figure 63. Spectre obtenu à un temps de rétention de 12.41 minutes.....	441



OBJETIVOS

La presencia de las sustancias farmacológicas en las aguas usadas para el regadío o en las matrices vegetales es desde hace tiempo un tema de interés que se focaliza en la investigación y acumulación de estas sustancias en el medioambiente. Para hacer frente a esta problemática, cada vez es más necesario realizar una evaluación, monitorización y diagnóstico medioambiental de las zonas afectadas por la contaminación para precisar que ecosistemas se encuentran bajo el efecto de los contaminantes y así evaluar la consecuencia que estos tienen sobre los seres vivos.

Esta Tesis forma parte de la línea principal de varios Proyectos de Investigación sucesivos que se centran en el estudio de los efectos de la contaminación sobre la flora autóctona del Parque Nacional de Doñana; en este caso, se intenta aportar datos cualitativos y cuantitativos al efecto de sustancias activas farmacológicamente (como contaminantes emergentes) en plantas de la zona. Se ha de destacar que los estudios al respecto son prácticamente inexistentes.

La realización de esta Tesis Doctoral incrementará el conocimiento sobre las consecuencias de la presión antropogénica sobre el ecosistema del Parque Nacional de Doñana, simulando a escala de laboratorio la presencia de los principales activos farmacológicos, sus compuestos de degradación y metabolitos, en matrices vegetales características de ese entorno natural, evaluando también la capacidad antioxidante y enzimática así como la identificación de moléculas inhibidoras de dichas enzimas en una colección de 150 plantas del mencionado entorno protegido.

Así, los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1.- Desarrollar, optimizar y validar una metodología analítica adecuada para la detección e identificación y la cuantificación de una selección de principios activos farmacológicos de amplio uso humano y/o veterinario (carbamazepina, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacin, ibuprofeno y diclofenaco) en las matrices vegetales utilizando cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas-tiempo de vuelo.

2.- Aplicar el método desarrollado a muestras vegetales presentes en el Parque Nacional de Doñana (*Lavandula dentata*, *Juncus sp.* y *Salicornia europaea*) y regadas con agua que contengan diferentes concentraciones de los principios activos farmacológicos seleccionados y evaluar la absorción de los mismos en las diferentes partes de la planta.

3.- Evaluar, empleando técnicas de análisis no dirigido, las muestras sometidas a los ensayos de exposición e identificar y, en su caso determinar, metabolitos y productos de degradación.

4.- Optimizar los métodos para evaluar las actividades antioxidantes e inhibidoras, empleando diferentes enzimas (tirosinasa, elastasa, collagenasa, lipoxigenasa), en los extractos de una selección de 150 plantas presentes en el Parque Nacional de Doñana.

5.- Aplicar los métodos enzimáticos optimizados para determinar la capacidad de inhibición enzimática en dicha colección de 150 plantas y en muestras seleccionadas de los ensayos de exposición.

6- Aislamiento e identificación, en los extractos de las plantas que presenten capacidad de inhibición enzimática, de las moléculas bioactivas responsables de dicha inhibición.



OBJECTIFS

La présence de substances pharmacologiques dans l'eau utilisée pour l'irrigation ou dans les matrices végétales est depuis longtemps un sujet d'intérêt qui porte sur la recherche et l'accumulation de ces substances dans l'environnement. Pour faire face à ce problème, il est de plus en plus nécessaire de procéder à une évaluation, un suivi et un diagnostic environnemental des zones affectées par la pollution afin de préciser quels écosystèmes sont sous l'effet des polluants et d'évaluer ainsi les conséquences que ceux-ci ont sur les êtres vivants.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de plusieurs projets de recherche successifs axés sur l'étude des effets de la pollution sur la faune indigène du Parc National de Doñana; lors de cette thèse, nous essayons de fournir des données qualitatives et quantitatives sur l'effet des substances pharmacologiquement actives (comme polluants émergents) dans les plantes de la région. Il convient de souligner qu'il n'existe pratiquement aucune étude à ce sujet.

Cette thèse de doctorat permettra ainsi d'accroître les connaissances sur les conséquences de la pression anthropique sur l'écosystème du Parc National de Doñana, en simulant à l'échelle du laboratoire la présence des principaux actifs pharmacologiques, leurs composés de dégradation et métabolites, dans des matrices végétales caractéristiques de cet environnement naturel. En parallèle, l'évaluation de la capacité antioxydante et du potentiel d'inhibition enzymatique ainsi que l'identification des molécules inhibitrices dans une collection de 150 plantes vise à valoriser les plantes de cet écosystème unique.

Ainsi, les objectifs de cette thèse de doctorat sont :

1.- Élaborer, optimiser et valider une méthodologie analytique adéquate pour la détection, l'identification et la quantification d'une sélection de principes pharmacologiques actifs à usage humain et/ou vétérinaire (ciprofloxacine, enrofloxacin, carbamazépine, fluméquine, ibuprofène et diclofénac) dans des matrices végétales par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

2.- Appliquer la méthode développée aux échantillons de plantes présents dans le Parc National de Doñana (*Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia europaea*) et irrigués avec de l'eau contenant différentes concentrations des principes actifs pharmacologiques sélectionnés et évaluer leur absorption dans les différentes parties des plantes.

3.- Évaluer, à l'aide de techniques d'analyse non dirigées, les échantillons soumis aux essais d'exposition et identifier et, le cas échéant, déterminer les métabolites et les produits de dégradation.

4.- Optimiser les méthodes d'évaluation des activités antioxydantes et inhibitrices, en utilisant différentes enzymes (tyrosinase, élastase, collagénase, lipoxygénase), pour l'étude d'extraits d'une sélection de 150 plantes présentes dans le Parc National Doñana.

5.- Appliquer des méthodes enzymatiques optimisées pour déterminer la capacité d'inhibition enzymatique dans cette collection de 150 plantes et dans des échantillons choisis parmi les essais d'exposition afin de potentiellement les valoriser pour des applications dermocosmétiques.

6.- Isolement et identification des molécules bioactives responsables de cette inhibition dans les extraits de plantes à pouvoir inhibiteur enzymatique.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Este primer capítulo de Tesis abordará la problemática de la contaminación ambiental, resaltando el papel de los denominados contaminantes emergentes que han sido objeto de estudio durante los últimos años por parte de la comunidad científica, debido al gran impacto que su presencia está causando en ecosistemas ambientales. Concretamente los fármacos constituyen un abundante grupo de compuestos, cuya presencia en el medioambiente se ha ido incrementando mucho más que cualquier otro contaminante desde los años 70.

Se focalizará la problemática en fármacos prescritos de forma habitual tanto para el consumo humano como para la ganadería, centrándonos en seis principios activos, carbamazepina, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacin, diclofenaco e ibuprofeno y sobre su efecto sobre tres tipos distintos de plantas que forman parte de la flora del Parque Nacional de Doñana: *Lavandula dentata*, *Juncus sp* y *Salicornia europaea*; asimismo, se abordará el estudio de los metabolitos o productos de degradación procedentes de esa interacción.

Su presencia en espacios protegidos como el Parque Nacional de Doñana, en cuyo entorno ya se han identificado varios principios activos farmacológicos en muestras de aguas [1], se atribuye principalmente a la ineficacia de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) para eliminar dichos compuestos en el tratamiento de aguas residuales. Asimismo, la presencia de explotaciones ganaderas en la zona constituye otro foco de entrada de este tipo de contaminantes emergentes debido fundamentalmente a su uso en el tratamiento de animales. Las características del entorno de Doñana formado por terrenos inundables y marismas favorecen la movilidad de contaminantes sus diferentes zonas.

Asimismo, se abordará el estudio de los metabolitos o productos de degradación de los principios activos seleccionados producidos en las matrices vegetales seleccionadas, tanto desde un punto de vista dirigido, siendo necesario por ello conocer y saber qué posibles metabolitos nos podemos encontrar, como desde un punto de vista no dirigido, buscando posibles compuestos no descritos hasta la fecha, así como los posibles usos que pueden tener dichas plantas en la descomposición de diversos contaminantes lo que permitiría emplearlas en procesos de biorremediación.

Por último, se realizará una revisión profunda de las distintas enzimas empleadas en los tests enzimáticos: tirosinasa, elastasa, colagenasa, lipoxigenasa, su estructura, su modo de acción y los inhibidores más utilizados en cada una de ellas. Se ha de conocer el comportamiento de estas enzimas, para ser capaces de reproducir su mecanismo de acción a nivel de laboratorio con el fin de encontrar posibles moléculas en las muestras de plantas analizadas con capacidad de inhibición sobre aquellas.

1. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU DIAGNOSTICO

El daño que el hombre ha generado sobre medio ambiente al satisfacer sus necesidades de vida ha dado lugar a distintos problemas de contaminación, y por ende, a graves problemas de salud, puesto que la presencia en el medio ambiente de uno o más contaminantes o cualquier combinación de ellos, perjudican la vida, la salud y el bienestar humano, la flora, la fauna, la degradación de la calidad del aire, de los suelos y de las aguas originando que se tomen las medidas necesarias para tratar de solucionar algunos problemas generados al medio ambiente [2].

La actividad humana tiene graves consecuencias en la contaminación de espacios naturales entre otros ecosistemas, favoreciendo la contaminación de aguas subterráneas y superficiales (ríos, lagos, embalses, acuíferos, humedales y mares) al encontrarse en estas, sustancias que modifican su composición, deterioran la calidad y dificultan la función ecológica del agua. Por ello, es necesario conocer los elementos y factores que contaminan dichos entornos, así como su implicación en el deterioro de la calidad de las mismas [3, 4].

Una de las principales vías de contaminación en entornos naturales son las aguas residuales, que representan un peligro al contener una alta cantidad de sustancias y/o microorganismos, siendo causa y medio de contaminación en los lugares donde son evacuadas sin un tratamiento previo. Se pueden clasificar según su diferente procedencia en, *aguas domésticas o aguas negras* que presentan una gran cantidad de materia orgánica, microorganismos, restos de jabones, detergentes y grasas al provenir de las heces y la orina humana, del aseo personal, de la limpieza de casa, etc. y *aguas blancas*, que pueden ser o bien de procedencia atmosférica como la lluvia, nieve y hielo o bien de la limpieza de espacios públicos como calles, parques, etc. Por último, *las aguas residuales no urbanas*, originadas bien por labores agrícolas y ganaderas en las zonas rurales o en los procesamientos llevados a cabo en las fábricas y establecimientos industriales, contienen aceites, detergentes, antibióticos, ácidos, grasas y otros productos de origen mineral. En numerosas ocasiones las aguas residuales se utilizan sin un tratamiento previo o tras tratamientos no completamente adecuados para el riego de cosechas, que al ser consumidos de forma cruda hace que se incorpore directamente al organismo sustancias tóxicas o microorganismos [4, 5].

A veces, no son los residuos los que provocan la desaparición de los organismos del agua, sino que para la descomposición de las sustancias contaminantes son necesarias grandes cantidades de oxígeno, pudiendo este agotarse, creando por tanto unas condiciones anóxicas que limitan la vida acuática, es por ello que en los últimos años se ha empezado a tomar conciencia sobre los niveles de resistencia y la adaptación de los seres vivos acuáticos a algunas sustancias y elementos presentes en el agua. Esto ha llevado a emplear la flora y fauna como bioindicadores de la calidad

de las aguas, puesto que su abundancia o ausencia en el medio indica el grado de contaminación de las mismas [5].

Entre las principales vías de contaminación cabe destacar:

-Los agentes patógenos: Comprenden todo tipo de entidades biológicas (bacterias, virus, parásitos u otros organismos) que son capaces de producir enfermedades en el ser humano, en la flora y en la fauna, al provenir de desechos de carácter orgánico que han sido vertido en ríos, lagos o embalses sin haber pasado previamente un proceso de depuración adecuado.

- Los compuestos químicos orgánicos: Hacen referencia a las sustancias químicas que contienen carbono y han sido fabricadas por el hombre como el petróleo, la gasolina, los plaguicidas o los plásticos que pueden llegar a permanecer en el agua durante más de 50 años.

-Los desechos orgánicos: Son el conjunto de residuos orgánicos (aceites, grasas, proteínas, etc.) producidos por los seres humanos o animales.

-Las sustancias químicas inorgánicas: Pertenecen a este grupo los ácidos, sales o metales tóxicos (mercurio o plomo) cuya presencia en grandes cantidades en las aguas produce daños en los sistemas acuáticos, disminuyendo la biodiversidad.

-Los nutrientes vegetales inorgánicos (nitrógeno y fósforo): El incremento de nitratos y fosfatos en las aguas modifican las condiciones del medio debido a la eutrofización, es decir, el crecimiento desmesurado de las algas y otros organismos, alterando el estado de las mismas al consumir una mayor cantidad de oxígeno.

-Los sedimentos o materias suspendidas: Son las partículas insolubles del suelo que enturbian las aguas y dificultan la vida de algunos organismos, cuya acumulación de sedimentos destruyen lugares de desove.

-Las sustancias radiactivas: Los isótopos radiactivos solubles pueden estar presentes en el agua como consecuencia de la actividad de las centrales termonucleares, más frecuentemente, por tratamientos y diagnósticos hospitalarios, siendo perjudiciales para los seres vivos.

-La contaminación térmica: La liberación de agua caliente proveniente de las centrales de energía o de actividades industriales, aumenta la temperatura de los ríos o embalses, disminuyendo el contenido de oxígeno presente en el agua y afectando de esta forma a la vida de las especies acuáticas [5].

1.1. LOS CONTAMINANTES EMERGENTES

En las últimas décadas se ha visto incrementado el número de contaminantes nuevos no regulados, denominados contaminantes emergentes. Estos compuestos presentan efectos significativos ya que afectan a la salud de los seres humanos y de las especies animales aún cuando se encuentran en bajas concentraciones alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, entre otros efectos tóxicos [6].

Un contaminante emergente es un material, elemento, compuesto, especie química, incluso un fenómeno físico desconocido o no reconocido cuya presencia en el medio ambiente, (alimentos, productos naturales, artificiales) o en cualquier ser vivo, no es reciente pero, pueden ser dañinos los resultados de su existencia. No estando regulado su control por las administraciones públicas y siendo muy limitadas la disponibilidad métodos y técnicas para su análisis [7].

Los vertidos de contaminantes emergentes se consideran un grave problema para el medioambiente y para la salud (como son los productos de higiene personal, detergentes, fragancias, surfactantes o fármacos, entre otros) [8], no precisamente porque su presencia en el medioambiente sea nueva, sino por su interés ambiental. Entre estos compuestos destacan: los retardantes de llama bromados, las parafinas cloradas, los pesticidas polares, los compuestos perfluorados, las drogas de abuso, los fármacos, y los metabolitos y/o productos de degradación de todas las sustancias anteriormente mencionadas [9].

Los **retardantes de llama bromados**, son utilizados en gran cantidad de productos comerciales, (muebles, plásticos, tejidos, pinturas, aparatos electrónicos, etc.) De ahí que se produzcan cerca de 200.000 toneladas al año [9], lo que ha hecho que se preste una mayor atención a este tipo de compuestos ya que encuentran en una gran cantidad de muestras, tanto ambientales, como humanas y animales [9, 10]. Todo esto sumado a la alta persistencia que tienen en el medio, su elevada biodisponibilidad, y los posibles efectos adversos (que no han sido completamente demostrados) como neurotoxicidad, disrupción endocrina y cáncer, hace que se haya incrementado el interés, la preocupación y el estudio de estas sustancias [9].

Las parafinas cloradas, son formulaciones industriales que consisten en mezclas técnicas de alcanos de cadena lineal policlorados con cadenas hidrocarbonadas que poseen entre 10 y 30 átomos de carbono y entre el 30-70% de cloro, siendo catalogadas por la Agencia para la Investigación del Cáncer como cancerígenas a partir de un grado de cloración del 60%. Estas mezclas comerciales se clasifican según la longitud de la cadena hidrocarbonada en parafinas cloradasdecadena larga (18-30 carbonos), de cadena media (14-17 carbonos) y de cadena corta (10-13 carbnos), que son las más tóxicas y utilizadas. Su producción mundial asciende a 200

formulaciones comerciales y a más de 300.000 toneladas al año. Debido a la baja volatilidad, solubilidad en agua y a su carácter lipofílico, poseen una fuerte tendencia a adsorberse en sedimentos en donde se observan las concentraciones más altas, aunque también tienden a bioacumularse en mamíferos aves y peces. Todo esto sumado a su uso excesivo y a una lenta degradación tanto química como biológicamente, hace que hayan empezado a ser objeto de estudio en los últimos años [9].

Los pesticidas, concretamente los más apolares, se han estudiado durante décadas, es por ello que se tiene un amplio conocimiento sobre su presencia y destino en el medio ambiente. Pero, recientemente se ha incrementado la preocupación de los productos de degradación de estos compuestos al ser, en muchos casos, más tóxicos que los compuestos de partida [9].

Los detergentes perfluorados son un ejemplo de compuestos de uso industrial que han sido empleados durante años en una gran cantidad de sectores y que ahora se vislumbran como contaminantes muy peligrosos y extensamente distribuidos en el medio ambiente. Es el caso del perfluorooctanosulfonato que es usado como refrigerante o detergente. Estos compuestos se han detectado en sangre e hígado humanos, en hígado y grasa de animales, en aguas superficiales y subterráneas [9, 11].

La presencia de **drogas de abuso** y los posibles efectos tanto de las drogas, como de sus principales metabolitos en el medio ambiente ha sido objeto de atención en los últimos años [9].

De todos los contaminantes emergentes, **los fármacos**, y en especial los antibióticos, son los contaminantes emergentes que provocan actualmente una mayor preocupación por el aumento de su uso en las últimas décadas, ya que son moléculas con muy diversa actividad biológica y sus propiedades fisicoquímicas determinan su persistencia en el ambiente, condicionando su distribución y facilitando su bioacumulación. Estos compuestos se encuentran generalmente en bajas concentraciones y la mayoría de ellos siguen sin estar regulados o reglamentados, desde el punto de vista medioambiental, por muchos países [9].

Los principios activos farmacológicos son sustancias químicamente definidas capaces de modificar la actividad celular en un organismo vivo y por tanto producir un efecto biológico, beneficioso o tóxico según la dosis suministrada [12, 13]. Al tratarse de sustancias, en la mayoría de los casos, solubles en agua, son capaces de estar presentes en todas las etapas del ciclo del agua, de forma que no hay una eliminación completa a pesar de los distintos procesos que se aplican en las plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que se incrementa la necesidad de conocer cuál es el efecto toxicológico sobre los organismos y por ende su consecuencia en las personas [14].

En los años 70, en EE. UU. se constataron las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático, al encontrarse en aguas residuales el ácido clofibrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilinclofibrato, y etofibrato). Sin embargo, no fue hasta principio de los años 90 cuando se tomó conciencia de la presencia masiva de fármacos en las aguas [9].

La extensa problemática que se presenta, radica en la enorme diversidad de fármacos existentes en cuanto a la estructura y funciones; sin embargo, todos poseen una serie de características en común: muchos son persistentes en el medioambiente, así como sus metabolitos y productos de transformación, por sus efectos fisiológicos la flora puede volverse más susceptible a sus impactos, aunque la concentración de fármacos sea baja, y la combinación de ellos puede tener efectos significativos debido a mecanismos de acción sinérgica [12, 15].

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana, se encuentran el ibuprofeno y el diclofenaco, pertenecientes a los grupos de analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y sulfametoxazol, seguidos por los betabloqueantes como metoprolol. De ahí que sean los grupos farmacológicos más investigados, además de ser cada vez más utilizados en veterinaria y en actividades como la acuicultura, la ganadería, o la avicultura [9].

Los medicamentos veterinarios están destinados a tratar las enfermedades y a proteger la salud de los animales. Su liberación al medio ambiente se produce de forma directa, como sucede en las granjas, indirectamente mediante la aplicación de estiércol animal (que contiene productos excretados a la tierra) o a través de los excrementos de animales directamente en el pasto [16, 17].

El impacto de los medicamentos veterinarios sobre el medio ambiente depende de las cantidades utilizadas, las prácticas de cría de los animales, el método de administración, la toxicidad ambiental, las propiedades físico-químicas, el tipo de suelo, el clima, las prácticas de manejo relativas al almacenamiento de estiércol y las tasas de degradación en el estiércol [16].

Dependiendo de las características de los suelos y de las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus metabolitos y productos de degradación, estos pueden alcanzar las aguas subterráneas (contaminando los acuíferos) [12, 18] o bien quedar retenidos en el suelo y acumularse llegando a afectar al ecosistema y a los seres vivos a través de la cadena trófica [9].

Las concentraciones a las que se han encontrado fármacos en aguas superficiales, debido a una incompleta eliminación en las plantas de depuración de aguas, o en aguas subterráneas como consecuencia de la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a

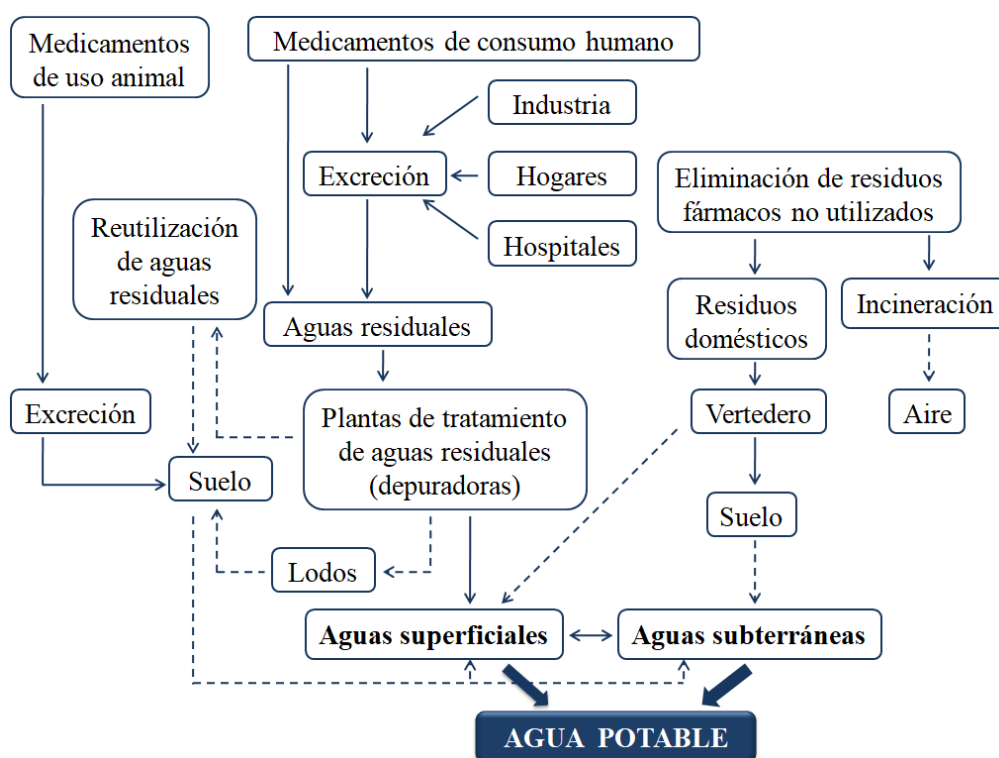


Figura 1. Rutas simplificadas de entrada de productos farmacéuticos al medio ambiente [12].

1.2. LOS FÁRMACOS

La farmacocinética estudia el curso temporal de las concentraciones de los fármacos en el organismo, es decir, cómo el organismo procesa el fármaco administrado, construyendo modelos para valorar o predecir la acción terapéutica o tóxica de un fármaco [21].

Se distinguen cuatro grandes procesos farmacocinéticos: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

1.- Absorción: Comprende la entrada del fármaco al organismo desde el exterior al medio interno, es decir, a la circulación sistemática. Atravesando las membranas biológicas por procesos pasivos de difusión (filtración a través de los poros o difusión pasiva directa), transporte especializado (difusión facilitada o transporte activo), endocitosis, exocitosis, utilización de ionóforos y utilización de liposomas [22]. Depende de las características físico-químicas del fármaco, en aquellos casos en los que el fármaco se administra por una vía diferente a la intravenosa, se produce un fenómeno conocido como eliminación persistémica, de forma que se produce la degradación de forma parcial del fármaco antes de su distribución en el organismo, haciendo así que su absorción sea incompleta, de igual manera antes de la distribución, el fármaco puede ser absorbido por el tracto gastrointestinal y ser metabolizado en el hígado, lo que se conoce como primer paso hepático [22, 23].

2.- Distribución: En esta etapa el fármaco es transportado desde el lugar de absorción hasta el de acción, permitiendo que llegue a los órganos en los que debe actuar o en los que se va a metabolizar, realizándose el transporte a través de la circulación sistemática y produciéndose de diferentes formas, como pueden ser la disolución en el plasma, la fijación a proteínas plasmáticas o la unión a las células sanguíneas, ya que para acceder al interior de las células y a las estructuras celulares, los fármacos deben atravesar las membranas orgánicas, es por ello que los fármacos más liposolubles penetran con más facilidad y se distribuyen con mayor rapidez que los fármacos hidrosolubles que suelen ser excretados sin modificar. La concentración activa del fármaco en el organismo humano disminuye como consecuencia del metabolismo y la excreción [22, 23].

3.- Metabolismo: Este es el proceso de biotransformación de los fármacos que debido a una serie de reacciones químicas y bioquímicas, produce otros compuestos que se pueden eliminar con mayor facilidad llamados metabolitos [23].

Estas reacciones son causadas por la actividad de ciertas enzimas que se encuentran principalmente en el hígado, aunque también están presentes en el riñón, el pulmón y el intestino de forma que un compuesto puede ser modificado en varios sitios de forma simultánea o transformado mediante reacciones sucesivas, dando como resultado un gran número de metabolitos que pueden ser clasificados según su actividad biológica en cuatro grupo: los metabolitos menos activos biológicamente (debido a la pérdida de su actividad biológica), los metabolitos activos desde un punto de vista terapéutico, cuyo compuesto inicial es denominado profármaco, los metabolitos activos aunque con una actividad terapéutica distinta a la del fármaco de partida y por último los metabolitos activos desde una perspectiva tóxica [23].

De esta forma el compuesto farmacéutico una vez excretado puede llegar al medioambiente de forma inalterada, sin sufrir ningún cambio, en forma de sus productos de degradación, como un metabolito principal o como una mezcla de varios metabolitos por diversas reacciones bioquímicas de oxidación, reducción, hidrólisis, conjugaciones, etc. Los fármacos liposolubles pueden transformarse en sustancias más ionizables y por ende más hidrosolubles. Por este motivo, el metabolismo es un proceso fundamental, que condiciona la actividad farmacológica del medicamento y su eliminación [12, 22, 23].

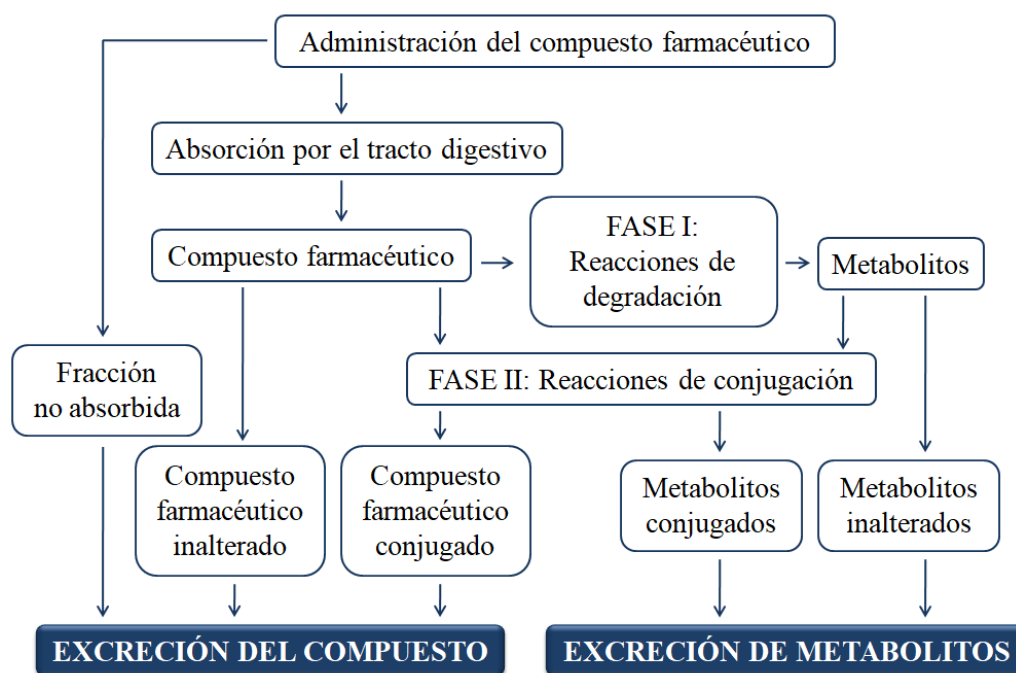


Figura 2. Reacciones de transformación de compuestos farmacológicos en el organismo [12].

Las reacciones responsables del metabolismo se clasifican en reacciones de fase I y reacciones de fase II.

Las reacciones de la fase I, reacciones de degradación: óxido-reducción e hidrólisis [12], en las cuales, los grupos funcionales que se incorporan a la molécula, como los grupos hidroxilo, los grupos amino o los grupos ácido carboxílico aumentando de su polaridad, resultado de estas reacciones puede ser la inactivación de la misma con su posterior excreción, o bien su transformación en otra más activa, susceptible de sufrir posteriores reacciones de fase II [23, 24].

Las reacciones de fase II, son reacciones de conjugación principalmente con el ácido glucurónico y otros compuestos endógenos del cuerpo [12]. Tienen como finalidad aumentar el tamaño de la molécula mediante el acoplamiento a un sustrato endógeno, provocando su

inactivación que en la mayoría de los casos, se producen sobre las moléculas del fármaco o sobre los productos de las reacciones de fase I [23, 24].

Las transferasas son las enzimas que se encuentran principalmente en el hígado y catalizan estas reacciones de conjugación cuyos productos se caracterizan por presentar, una mayor polaridad y ser más solubles en agua que el compuesto de partida, lo que hace que sean excretados con mayor facilidad [23]. En función del sustrato con el que se produzca la reacción, se distinguen varios tipos de conjugación de los que cabe destacar la glucuronidación que consiste en la conjugación del ácido glucurónico con alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, aminas aromáticas y tioles. Siendo considerada como una de las vías metabólicas más importantes en el caso de los fármacos cuyos productos se denominan glucurónidos [23].

Las oxidaciones, al ser muy diversas, son la vía de transformación más habitual, generándose la pérdida de parte de la molécula o la incorporación de oxígeno a la misma, se pueden diferenciar dos tipos de oxidaciones, las oxidaciones microsómicas que son las más frecuentes en el metabolismo de fármacos y las oxidaciones no microsómicas, estas son menos comunes y están catalizadas por distintas enzimas, entre las que se encuentra el complejo citocromo P450 y la flavinmonooxigenasa (FMO) localizada fundamentalmente en el microsoma hepático [23].

Todo este proceso metabólico tiene lugar en humanos, si nos centramos en los animales, nos encontramos, que la farmacocinética varía según la especie de manera que en los animales carnívoros y omnívoros al ser monogástricos, presentan un proceso de absorción parecido al que se produce en humanos teniendo lugar en el intestino delgado, produciéndose el metabolismo en el hígado [23, 25].

4.- Excreción: Esta es la etapa por la cual los fármacos llegan al medioambiente, la forma en la que llega depende de las condiciones idiosincráticas de cada individuo para metabolizar el principio activo, lo cual depende de la edad, sexo y salud [12, 23].

1.3. PROBLEMÁTICA DE LOS FÁRMACOS EN EL MEDIOAMBIENTE

Las sustancias farmacológicamente activas incluyen compuestos formados por moléculas relativamente grandes y químicamente complejas, con diferentes pesos moleculares, estructuras y funcionalidad. Además suelen ser moléculas polares con más de un grupo ionizable, con persistencias en el medio ambiente de más de un año para fármacos como la eritromicina, ciclofosfamida, naproxeno, sulfametoxazol, etc. y de varios años para el ácido clofíbrico, por lo que pueden acumularse alcanzando niveles que los conviertan en biológicamente muy activos [26].

Así, por ejemplo, sólo un 2-3% de la dosis administrada de carbamazepina es excretada sin cambios. Para el diclofenaco, se excreta el 1% como tal y el 60% en forma de glucurónidos. En el caso del bezafibrato que es un antilipemiente, de la dosis administrada, se excreta un 50% en forma de glucurónidos y un 20% en su forma original [26, 27].

Por otro lado, y aunque a corto plazo parece que no se pueden detectar efectos graves sobre la salud o sobre el medio ambiente, sí resultan probables, los efectos potencialmente acumulativos de los fármacos a medio y largo plazo ya que pueden ocasionar cambios en el medio ambiente y/o daños en el hombre, como son tanto la proliferación de microorganismos resistentes a los antibióticos y la combinación de diferentes metabolitos y compuestos biológicamente activos formando una especie de cóctel farmacológico puede ser capaz de potenciar los efectos negativos [26].

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) no eliminan totalmente los fármacos de las aguas residuales, existiendo además evidencias de que muchas de estas sustancias son poco o nada biodegradadas en el medio ambiente [26, 28]. Los compuestos hidrofílicos resistentes a la degradación pueden permanecer disueltos en la fase acuosa o adsorberse a los fangos [26].

Como se ha mencionado anteriormente, las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio ambiente hacen referencia a la detección del ácido clofíbrico, en aguas residuales de EE.UU. en la década de los años 70. En España se ha constatado la presencia de otros fármacos, como en los análisis realizados en el río Ebro en el año 2005, detectándose ibuprofeno ($60 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), acetaminofen ($42 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), gemfibrozil ($46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), atenolol ($72 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) y carbamazepina ($30 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) [29]; esta última fue también detectada en los años 90 en aguas superficiales de Alemania en concentraciones de $1075 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [30]. Es por ello que diversos autores han constatado que la carbamazepina no es eliminada de forma total de las aguas residuales al pasar por los sistemas de tratamiento de aguas [31].

Cuatro de los fármacos más comúnmente utilizados: paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco, únicamente el diclofenaco tiene bajos rendimientos de eliminación mientras que los tres primeros son fácilmente degradados en las depuradoras, de hecho solo un 4% del paracetamol es eliminado, en tanto que la amoxicilina lo es en un 60%. El bezafibrato (10-97%) y el ibuprofeno (12-86%) se eliminan parcialmente en las EDAR, con rendimientos claramente dependientes de la edad de los lodos, sin embargo, en el caso del diclofenaco, la reducción es independiente de la edad del lodo [26, 32, 33].

Entre el grupo de los antibióticos, las penicilinas se hidrolizan fácilmente en el agua mientras que las tetraciclinas precipitan fácilmente con cationes como el calcio, acumulándose en los lodos [26, 34].

La mayor parte de estas sustancias al no ser degradadas completamente en las depuradoras de aguas residuales, son vertidas con los efluentes y acaban en las aguas superficiales y subterráneas. En estudios realizados a comienzos del siglo XXI con analgésicos, antilipemiantes y anticonvulsivos, se ha demostrado que para todos estos fármacos salvo para los antiepilépticos, las plantas depuradoras que trabajaban con sistema de lodos activados mostraban concentraciones inferiores de analgésicos y antilipemiantes en sus efluentes en comparación con las depuradoras que operaban sin tratamiento de lodos [26].

En el caso del diclofenaco, diversas investigaciones confirman que produce efectos adversos perjudiciales a una amplia variedad de especies de la fauna salvaje. Estos efectos negativos se centran en el sistema renal de la mayoría de estas especies de animales, siendo particularmente perjudicial en las aves [16, 35].

En numerosos estudios científicos se ha constatado que la utilización del diclofenaco en el ganado provocaba una insuficiencia renal en las aves carroñeras que ingerían los cadáveres medicados, con la consiguiente muerte de dichos individuos [36]. observándose que varias águilas esteparias (*Aquila nipalensis*) encontradas muertas en un vertedero del estado de Rajastán (India) tenían residuos de diclofenaco en sus tejidos y presentaban los mismos signos clínicos de insuficiencia renal observados en buitres de género *Gyps* intoxicados por este fármaco [16]. El descenso de la población de buitres fue causado fundamentalmente por el diclofenaco [16, 37], que se utilizaba para tratar el ganado doméstico frente a distintas patologías, de forma que los buitres estaban expuestos al fármaco cuando consumían los cadáveres de los animales que habían sido tratados con este fármaco poco antes de la muerte. Estas aves carroñeras morían por fallo renal poco días después de la exposición, es decir, tras la ingesta de los tejidos contaminados con diclofenaco. De igual manera, se ha descrito que el diclofenaco afecta a los tejidos de las branquias y de riñones en peces de agua dulce, lo que sugiere también un posible riesgo para este tipo de poblaciones [16].

1.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ESTUDIADOS

1.4.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son desde el punto de vista químico un grupo de fármacos heterogéneos [38], en general son ácidos débiles que son secuestrados al interior de las células que se encuentran en medios ácidos, como en el estómago, el riñón o las articulaciones inflamadas; este proceso se denomina atrapamiento iónico [38, 39].

El principal mecanismo de acción de estos fármacos es la inhibición la producción de prostanoideos mediante el bloqueo de la enzima ciclooxigenasa (COX), por tanto inhibían la formación de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), dentro de la vía metabólica del ácido araquidónico. Las PGs regulan situaciones patológicas, como pueden ser los procesos inflamatorios, el dolor y la fiebre mientras que los TXs, son miembros de la familia de los eicosanoides, grupo de sustancias lipídicas que poseen un gran espectro de acciones biológicas [38].

En 1991 se comprobó que no existía una sola enzima COX, sino que al menos había dos tipos: se denominaron COX-1 y COX-2 que presentan la misma afinidad por el ácido araquidónico y una capacidad similar para convertirlo en PGH_2 (forma precursora de las otras PGs) [38].

Ambas enzimas muestran un 60% de identidad aminoácida [40], poseen la misma masa molecular y tienen sitios activos similares para su sustrato natural y para el bloqueo por AINEs, unos inhibirán sobre todo la COX-1, otros desarrollaran preferencia sobre la COX-2, algunos serán inhibidores exclusivos de la COX-2 y sin embargo otros lo serán de ambas isoenzimas de forma equivalente, ya que todos los AINEs comparten modo de acción pero no todos presentan la misma afinidad por la enzima [38, 40].

De manera que los AINEs se unirían a la COX, bloqueando la transformación de ácido araquidónico en prostaglandinas, provocando que el metabolismo del ácido araquidónico se desplace por otra ruta: la de la lipooxigenasa, originando a un aumento de la producción de otros mediadores químicos, pertenecientes igualmente a la familia de los eicosanoides, como son los leucotrienos (LTs) [38].

La inhibición reversible competitiva con el ácido araquidónico es el proceso por el cual actúan la mayoría de los AINEs, aunque el mecanismo de interferencia de la COX no es común para todos los AINEs, cabe destacar la inhibición irreversible llevada a cabo exclusivamente por el ácido acetilsalicílico, así como la inhibición reversible no competitiva realizada por el paracetamol [40].

La enzima COX-1 se ha clasificado como una enzima constitutiva, es decir, presente en la mayoría de los tejidos y plaquetas sanguíneas desarrollando un gran papel fisiológico al estar involucrada en las funciones de regulación de la actividad celular, como coordinación de la acción de las hormonas circulantes y de la homeostasia vascular, mientras que la COX-2 es una enzima de tipo inducible, que está ausente o en muy bajas concentraciones en las células normales, pero es estimulada a gran velocidad por mediadores inflamatorios, el factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento o endotoxinas bacterianas que se liberan en el lugar de inflamación [37, 39].

En la siguiente figura se muestra de forma esquemática la liberación y síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico, siendo HPETE el ácido hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico y PGG₂ la prostaglandina G₂ [38].

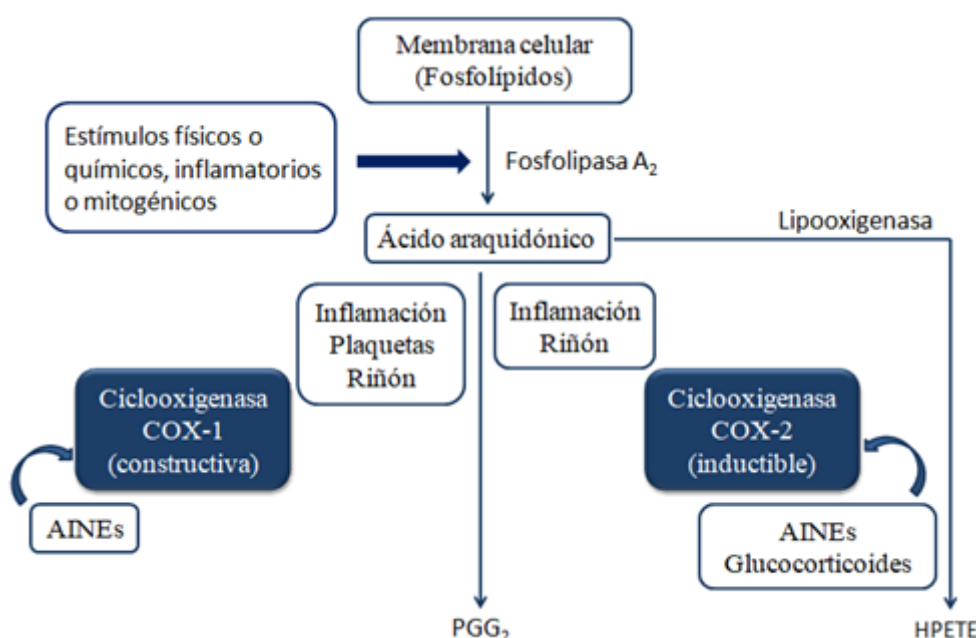


Figura 3. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico [38].

La inhibición de la COX-2 evidenciaría la actividad antiinflamatoria, mientras que la inhibición de la COX-1 justificaría los efectos adversos, al suprimirse la síntesis de eicosanoides necesarios para las funciones fisiológicas del organismo [40]. Por lo que la mayor o menor actividad frente a cada una de estas isoenzimas sería crucial en la incidencia de los efectos adversos que surgen tras la administración de distintos AINEs a dosis terapéuticas [40].

Al ser la mayoría de los AINEs ácidos orgánicos débiles, su eliminación renal varía según el pH de la orina. El atrapamiento iónico de las moléculas ionizadas (poco liposolubles) en orinas

alcalinas favorece la excreción en los herbívoros, observándose lo opuesto en carnívoros y omnívoros, en los cuales la orina es generalmente ácida, por lo que la ionización está suprimida, la molécula es más liposoluble y por lo tanto fácilmente reabsorbida [40]. Es por ello que solo pequeñas fracciones de la dosis administrada de la mayoría de los AINEs son eliminadas sin transformaciones en orina, con independencia de la especie, asumiéndose que casi todos los AINEs son inicialmente biotransformados a nivel hepático a metabolitos activos o inactivos. Como es el caso del ácido acetilsalicílico y la fenilbutazona que son convertidas respectivamente a salicilato y la oxifenbutazona, metabolitos mucho más activos que el fármaco inicial [40].

1.4.1.1. DICLOFENACO

El diclofenaco es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, perteneciente a la familia de los ácidos aril-acéticos, teniendo como principal misión farmacológica la reducción de la fiebre, el dolor y la inflamación, mediante la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico [16, 41].

La biotransformación del diclofenaco tiene lugar por glucuronidación de la molécula intacta, ya que aproximadamente el 60% de la dosis administrada de diclofenaco se excreta con la orina como conjugado glucurónico de la molécula intacta, de manera que solo el 1% se excreta como sustancia inalterada. El resto de la dosis se elimina como metabolitos principalmente por hidroxilación y metoxilación, la mayoría de los cuales son también convertidos a conjugados glucurónicos, (3'-hidroxi-, 4'-hidroxi-, 5-hidroxi-, 4'5-dihidroxi- y 3'-hidroxi-4'-metoxi diclofenaco) a través de la bilis con las heces y siendo biológicamente activos pero en mucho menor grado que el diclofenaco [42].

Entre los efectos secundarios y las reacciones adversas, cabe destacar los trastornos digestivos, trastornos del sistema nervioso central, de los sentidos, en la piel y trastornos renales, estos últimos son los más significativos en animales susceptibles, dando lugar a insuficiencia renal aguda que suele ser reversible tras la retirada del fármaco [16, 41].

La presencia de diclofenaco en las aguas residuales es un problema debido a su baja tasa de eliminación en los procesos de tratamiento de aguas residuales, lo que hace que el diclofenaco sea uno de los principios activos más frecuentes en los efluentes de las aguas superficiales, cuyas concentraciones van desde $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [9].

1.4.1.2. IBUPROFENO

El ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido propanóico con marcadas propiedades antiinflamatorias, analgésicas, y antipiréticas.

Es ampliamente metabolizado en el hígado por hidroxilación y carboxilación del grupo isobutilo careciendo sus metabolitos de actividad farmacológica, cuya eliminación (principalmente renal) se considera total al cabo de 24 horas. Aproximadamente un 10% se elimina de forma inalterada, en cambio un 90% se elimina en forma de metabolitos inactivos, principalmente como glucurónidos [42]. Además, en las primeras 24 horas se elimina el 60% de la dosis mientras que en los 5 días posteriores a la ingesta de ibuprofeno se elimina del 80 al 100% de la cantidad del fármaco [23, 43].

Entre los procesos de biotransformación que puede sufrir este fármaco en el organismo destacan la inversión enantiomérica y el metabolismo oxidativo [23]. La inversión enantiomérica es necesaria para que se genere la transformación del forma del ibuprofeno R (-), que es inactiva, al enantiómero S (+), que es farmacológicamente activo [23, 44]. Mientras que el metabolismo oxidativo, produce varios metabolitos que serán eliminados en distintas concentraciones y por diversas vías. De forma que aproximadamente el 66% del fármaco se excreta por vía renal; mientras que el 34% por vía biliar [23].

Obteniéndose cuatro metabolitos, de los cuales tres de ellos son productos de la hidroxilación alifática del ibuprofeno (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y 3-hidroxiibuprofeno) y siendo el carboxibuprofeno, producto de la oxidación del 3-hidroxiibuprofeno hasta ácido carboxílico [23, 44].

Puesto que la molécula de ibuprofeno presenta carácter quiral, sus metabolitos tendrán también centros quirales, dando lugar a la aparición de enantiómeros y estereoisómeros, como por ejemplo los dos enantiómeros del 2-hidroxiibuprofeno y los cuatro estereoisómeros del carboxiibuprofeno [23, 44].

1.4.2. ANTIEPILÉPTICOS

1.4.2.1. CARBAMAZEPINA

La carbamazepina es un fármaco anticonvulsivante que se utiliza en el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas y de las crisis complejas o simples (con o sin pérdida de la conciencia), aunque también se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de algunos

desórdenes psiquiátricos, como son la manía depresiva y la conducta agresiva producida en la demencia senil, así como en el tratamiento del dolor de origen neurológico, posee adicionalmente, propiedades anticolinérgicas, antirrítmicas, relajantes musculares, sedantes y bloqueantes neuromusculares [45, 46, 47].

El mecanismo de acción de la carbamazepina no es del todo bien conocido, se cree que estabiliza las membranas nerviosas hiperexcitadas, inhibe las descargas neuronales y por tanto reduce la propagación sináptica de los impulsos excitatorios. Previene de esta forma las descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio en las neuronas despolarizadas vía uso y bloqueando de los canales de sodio voltaje dependientes [45, 47].

Por otra parte, la reducción del glutamato y la estabilización de las membranas neuronales pueden ser los responsables de los efectos antiepilépticos, en tanto que los efectos antipsicóticos se deben a la reducción de la producción de dopamina y de la noradrenalina [45].

Después de una administración oral de carbamazepina es excretado el 28% en las heces y el 72% es en la orina, de la cual aproximadamente el 2% no sufre modificaciones, alcanzando el medio ambiente a través de las aguas residuales y cerca del 1% se elimina como 10,11-epóxido-carbamazepina, metabolito farmacológicamente activo [45], siendo otros metabolitos importantes el derivado 10,11-transdiol y su glucurónido, la baja eficacia de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales [31], así como el metabolito 10,11-dihidro-10-hidroxi-carbamazepina, encontrado junto con el metabolito 10,11-epóxido-carbamazepina en altas concentraciones en aguas superficiales [48].

1.4.3. FLUOROQUINOLONAS

Las quinolonas son una familia de antibióticos de gran importancia en el manejo de muchas enfermedades comunitarias y nosocomiales [49].

El origen de las quinolonas fue el ácido nalidixico (quinolona de primera generación) [49] descubierto por Leshner en 1962, que presentaba una actividad antimicrobiana efectiva contra bacterias Gram-negativas y alcanzaba unas concentraciones terapéuticas en orina por lo que solo se empleaban para tratar infecciones del sistema urinario. Los compuestos que lo siguieron (ácido oxolínico, ácido pipemidico, cinoxacina) no presentaban grandes diferencias con respecto a la molécula inicial, pero posteriormente en 1985 aparecieron las fluoroquinolonas con unas propiedades farmacocinéticas muy ventajosas y una toxicidad muy reducida lo que hacen que hoy en día sigan estando muy presentes en la investigación científica para la obtención de nuevos

medicamentos antibacterianos. Desde el punto de vista microbiológico, originalmente eran activas contra gérmenes aerobios Gram-negativos, pero más tarde extendieron su espectro hacia aerobios Gram-positivos y bacterias atípicas. Actualmente las nuevas fluoroquinolonas por el momento empleadas únicamente en medicina humana, también son activas contra gérmenes anaerobios [50].

Las fluoroquinolonas surgen con la incorporación de un átomo de flúor en la molécula. La sustitución de un átomo de flúor en la posición seis, mejora la unión a su enzima diana, el ADN girasa bacteriana, aumentando de esta forma la introducción dentro de la célula hasta 70 veces con respecto a las quinolonas, la incorporación del flúor supuso un salto cualitativo en el desarrollo de estos compuestos, puesto que no se incrementó solamente la eficacia contra los patógenos Gram-negativos, sino que también se aumentó el espectro de actividad al actuar contra los patógenos Gram-positivos [51], absorbiéndose muy bien por vía oral, lo que hace que se alcancen importantes concentraciones tisulares y al poseer una vida media relativamente prolongada permiten ser dosificarlas en intervalos de 12 a 24 horas [50].

Las quinolonas son agentes totalmente sintéticos bactericidas cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del ADN bacteriano, introducen a la célula a través de porinas (canales de agua de la membrana), e interfieren con la acción del ADN girasa una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al ADN, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo (topoisomerasa II), al inhibir esta enzima forman complejos enzimáticos con la misma, esto ocurre para los gérmenes Gram-negativos. Para gérmenes Gram-positivos la acción es mayoritariamente a nivel de los complejos de la topoisomerasa tipo IV [49, 51].

En el caso de las fluoroquinolonas su mecanismo de acción es el mismo que el de las quinolonas pero tienen una excelente actividad contra una gran variedad de patógenos veterinarios Gram negativos y han demostrado significativa actividad contra patógenos intracelulares [51].

Posteriormente surgieron las quinolonas de segunda generación, como la ciprofloxacina y la enrofloxacin y tercera de tercera que poseen una amplia utilidad terapéutica a partir de una serie de modificaciones estructurales que determinan sus características farmacológicas que permiten su uso por vía oral para tratar de manera eficaz diversas infecciones sistémicas, las cuales anteriormente solo podían ser tratadas con antibióticos, es por ello que poseen un espectro de acción extraordinario [49, 51, 52, 53].

Aunque se han sintetizado muchas de ellas, las más conocidas entre las desarrolladas y usadas en medicina y veterinaria incluyen la amifloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina o norfloxacina [51].

1.4.3.1. CIPROFLOXACINA

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano de la clase de las fluoroquinolonas, activo frente a un amplio espectro de gérmenes Gram-negativos aerobios y frente a gérmenes Gram-positivos [51, 54].

Los efectos antibacterianos de la ciprofloxacina se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y de la ADN-girasa bacteriana que tiene dos subunidades. Estas topoisomerasas alteran el ADN introduciendo pliegues súper helicoidales en el ADN de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del ADN bacteriano, aunque no se conoce con exactitud porqué la inhibición de la ADN-girasa conduce a la muerte de la bacteria [54].

La ciprofloxacina se distribuye ampliamente por todo el organismo, siendo mínima su unión a las proteínas del plasma, sin embargo alcanza grandes concentraciones en la bilis, los pulmones, los riñones, el hígado, la vejiga, el útero, el tejido prostático, el endometrio, las trompas de Falopio y los ovarios. En los pacientes con la función renal la normal semi-vida de eliminación es de 3-5 horas, pero puede aumentar a 12 horas en sujetos con insuficiencia renal [54].

1.4.3.2. ENROFLOXACINA

La enrofloxacin es un fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria, considerado poco tóxico en la mayoría de los animales aunque presenta efectos tóxicos en algunas especies animales [51].

Presenta un alto índice terapéutico pudiendo suministrarse de forma eficaz y segura en terapias combinadas con otros medicamentos, lo que hace que sea muy empleada en diferentes especies domésticas, exóticas y silvestres [55]. Así por ejemplo, en bovinos, ovinos y equinos la enrofloxacin tiene una amplia y rápida distribución por todo el organismo, lo mismo ocurre en terneros, encontrándose concentraciones altas a las 12 horas de administración de la dosis en bilis, orina, hígado, riñones, corazón, pulmón y bazo. En cerdos la eliminación se produce de forma lenta pero con niveles elevados en las mucosas nasales, pulmones, hígado, músculo, tejido linfático y pared intestinal. De igual manera, se ha observado un incremento en la frecuencia e intensidad de los ataques en perros epilépticos bajo tratamiento cuando se encuentran bajo la administración de enrofloxacin [56, 57].

La enrofloxacin se metaboliza a ciprofloxacina [53], (principalmente en el hígado) la cual es responsable de una considerable parte de la actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales [55].

1.4.3.3. FLUMEQUINA

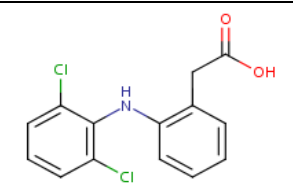
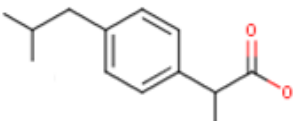
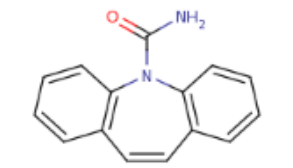
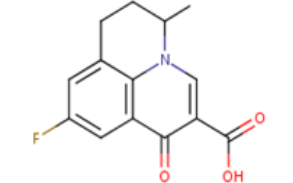
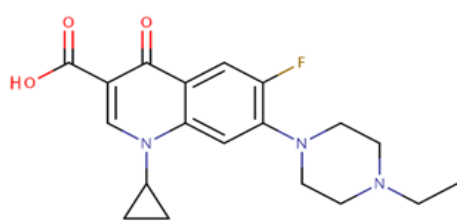
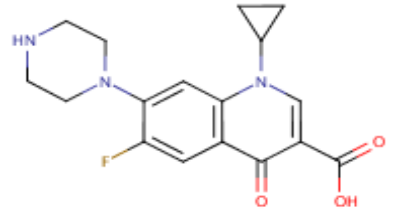
La flumequina es una quinolona monofluorada de primera generación su actividad bactericida cuyo espectro de acción se centra principalmente en bacterias Gram negativas aunque también actúa sobre las Gram-positivas. Su mecanismo de acción, al igual que el resto de las quinolonas ocurre por la inhibición de la ADN-girasa (topoisomerasa II) bacteriana, impidiendo la rotación axial negativa de la molécula de ADN y de la topoisomerasa IV bloqueando el proceso de replicación, transcripción y recombinación del ADN bacteriano [58, 59].

Tras su administración oral alcanza a las 2 horas su concentración máxima plasmática, localizándose en sangre flumequina inalterada y su metabolito hidroxilado, con menor actividad. Entre el 40 y 60% de la dosis absorbida en forma de fármaco sin modificar es excretada por la orina mientras que el resto es eliminado en forma de metabolito inactivo glucoconjugado, en tanto que una pequeña porción se elimina por heces [59].

En peces, después de su absorción por vía oral se aprecia una distribución de forma rápida y amplia por todo el organismo, realizándose el metabolismo en el hígado y la excreción en su mayoritariamente en forma de flumequina inalterada en la agallas como es el caso del salmón (60%), vía urinaria y vía biliar que presentan concentraciones más altas en agallas e hígado y en menor proporción en los huesos y piel y por último en músculo [58].

En la siguiente tabla se recogen los principios activos de estudios, sus estructuras composiciones elementales, así como sus propiedades físicoquímicas y las siglas utilizadas para nombrarlos a lo largo de esta Tesis.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos seleccionados.

Compuesto	Sigla	Estructura	Clase terapéutica	Log P	pKa	logKow	Composición elemental
Diclofenaco	DCL		Antiinflamatorio no esteroide	4.02	4.15	4.51	$C_{14}H_{13}Cl_2NO_2$
Ibuprofeno	IBU		Antiinflamatorio no esteroide	3.72	4.41	3.97	$C_{13}H_{18}O_2$
Carbamazepina	CBZ		Agente antiepiléptico	2.67	13.9	2.45	$C_{15}H_{12}N_2O$
Flumequina	FMQ		Antibiótico	2.41	5.70	2.60	$C_{14}H_{12}FNO_3$
Enrofloxacin	ENR		Antibiótico	1.88	6.43	0.70	$C_{19}H_{22}FN_3O_4$
Ciprofloxacina	CPR		Antibiótico	0.65	6.43	0.28	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$

2. METABOLISMO EN PLANTAS

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples u obtener sustancias más simples a partir de la degradación de sustancias complejas. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, presentes en todos los seres vivos, como es el caso de los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos que desempeñan las mismas funciones en todas las plantas, estos forman parte del metabolismo primario [60].

Los organismos vegetales producen una gran diversidad de compuestos químicos, una parte de estos son sintetizados en las rutas del metabolismo primario, a partir del cual se producen los componentes que participan en el proceso fotosintético o en el metabolismo respiratorio. El resto, que no son directamente esenciales para estos procesos, se originan por las vías del metabolismo secundario [61], que les permite producir y acumular distintos compuestos químicos, ya que las plantas destinan una parte del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de distintas moléculas orgánicas que no poseen una función evidente en los procesos de fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos y que se denominan metabolitos secundarios, ya que provienen del metabolismo secundario de las plantas [60].

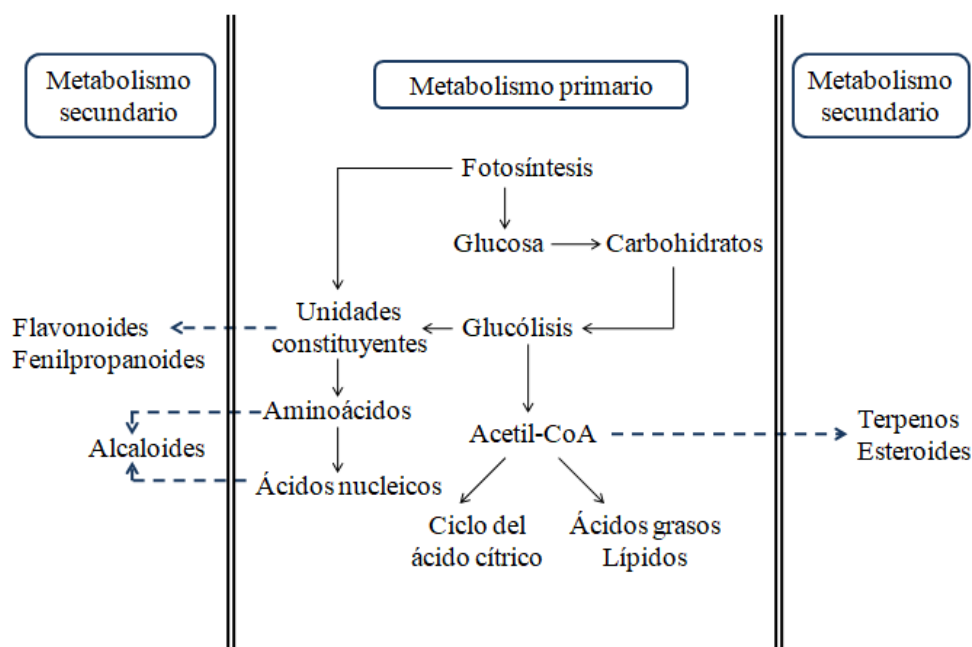


Figura 4. Elementos básicos del metabolismo de plantas [60].

Estos metabolitos secundarios, aparte de no presentar una función específica en los procesos anteriormente mencionados, se diferencian de los metabolitos primarios por tener una distribución limitada en el reino vegetal, es decir, no en todos los grupos de plantas se encuentran todos los metabolitos secundarios, puesto que la cantidad, la síntesis de metabolitos secundarios y la relación entre distintos constituyentes dependen tanto del género y de la familia a la que pertenezca la planta, como de los factores internos y externos que la rodean, es decir, de su relación con el medio ambiente [60].

La capacidad para sintetizar compuestos secundarios ha sido seleccionada mediante el curso de la evolución según las necesidades de cada planta. Las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado y la presión ejercida por estos a lo largo del proceso evolutivo establecen el desarrollo en los vegetales de rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios [61]. Desarrollando un papel trascendental en las interacciones de la planta con el medio que les rodea, como por ejemplo, los aromas florales y los pigmentos se emplean para atraer polinizadores, principalmente insectos [61, 62].

Las plantas sometidas al estrés almacenan con frecuencia estos metabolitos como respuesta a elicitores o señales moleculares producidas por la acción de microorganismos patógenos o un ambiente desfavorable, que la planta identifica gracias a los receptores presentes en la célula vegetal [61].

Se calcula que el genoma vegetal contiene entre 20.000 y 60.000 genes y posiblemente entre un 15 y un 25% de esos genes están implicados en el metabolismo secundario. El genoma de una especie vegetal específica descifra únicamente una parte irrelevante de todas las enzimas que serían necesarias para sintetizar el conjunto completo de metabolitos secundarios hallados en el reino vegetal [61].

Las plantas aromáticas y medicinales poseen relación con todo lo desarrollado al caracterizarse por la producción, derivada del metabolismo secundario, de una serie de componentes llamados principios activos, con aplicaciones en la medicina, industria aromática y alimentaria [61]. En las plantas aromáticas, sus principios están formados, total o parcialmente, por aceites esenciales que otorgan a las plantas, a su extracto o a los productos con los que se mezcle, un aroma agradable al olfato [61, 63].

Diversos estudios científicos realizados en los últimos años demuestran la capacidad que tienen las plantas para acumular los contaminantes emergentes en el suelo y en los tejidos

comestibles. Así numerosas investigaciones han demostrado por ejemplo que la presencia de los pesticidas, son metabolizados por las plantas en las fases I, II y III [64].

Las enzimas que presentan una elevada capacidad metabólica, capaces de desintoxicar los compuestos xenobióticos, son la citocromo P450 monooxigenasa, la glicisiltransferasa y la glutatión S-transferasa [65].

Estas se encuentran distribuidas en las tres grandes fases del metabolismo vegetal, la **fase I**, tiene lugar en el retículo endoplasmático de la célula vegetal la transformación de los compuestos xenobioticos a compuestos más solubles a través del citocromo P450 monooxigenasa, mediante procesos de transformación como la oxidación, la reducción y la hidrólisis, siendo más reactivos que el compuesto original por la incorporación de grupos funcionales como $-OH$, $-NH_2$, o $-SH$ [64, 66, 67].

A continuación en la **fase II** que se produce en el aparato de Golgi la conjugación con glucósidos a través de la enzima glicisiltransferasa o una glutatión vía glutatión S-transferasa, o aminoácidos para disminuir la toxicidad, es decir, los compuesto activados se conjugaron también con moléculas endógenas, como carbohidratos, ácido malónico o sulfato, la conjugación de aminoácidos es generada como una reacción lateral en lugar de un paso principal de desintoxicación [64, 66].

Finalmente en la **fase III**, se produce la compartimentación de xenobióticos y metabolitos en la vacuola (almacenamiento en la vacuola de la planta) con su siguiente reacción de mediante la unión a la pared celular [64, 66]. En la siguiente figura [68] se muestra el corte de una célula vegetal y sus tres fases del metabolismo de los compuestos xenobioticos.

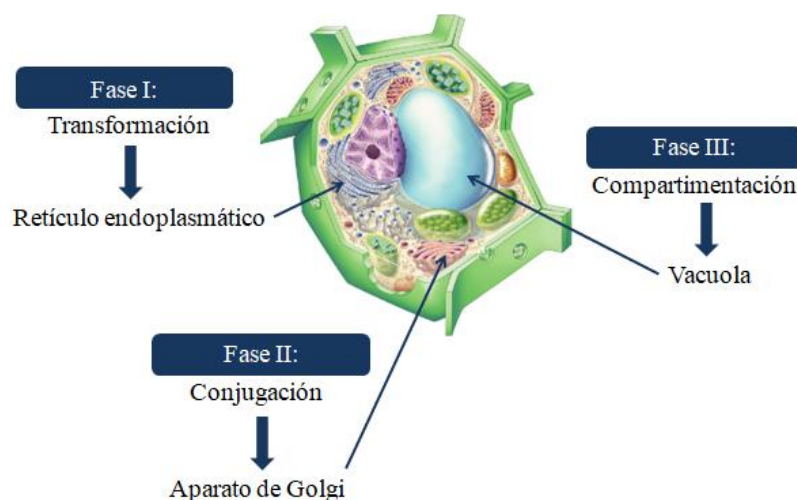


Figura 5. Célula vegetal.

Por ejemplo en el caso del diclofenaco, este experimenta un metabolismo rápido, en el cual los principales metabolitos provenientes de la fase I y la fase II son las formas hidroxiladas 4-OH-diclofenaco y 5-OH-diclofenaco y las formas conjugadas 4-O-glucopiranosiloxidiclofenaco y 4-OH-glutation y diclofenaco [69, 70], además según los autores, se ha constatado la formación del reactivo diclofenaco-2,5-iminoquinona, debido a la actividad de las peroxidasas de las plantas [69, 71].

En mamíferos se produce inicialmente una hidroxilación de uno de los anillos de fenilo que se cataliza mediante el citocromo P450 monooxigenasas, los dos metabolitos más comunes son el 3' y el 4'OH-diclofenaco y una forma doble hidroxilada en la posición 4' y 5', a continuación tiene lugar el metabolismo en la fase que se realiza a través de la glucuronidación en el grupo ácido carboxílico de la molécula, formándose en muy pequeñas cantidades los conjugados de sulfato y glutatión, pero solo conocido en mamíferos [70].

3. PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

En la década de los años 80 surgió el término de biorremediación, referido a la posibilidad de aplicar estrategias de remediación ambiental con una base biológica [72], utilizando la capacidad de los microorganismos para realizar procesos degradativos, limpiar el suelo y las aguas contaminadas, es decir, utilizar elementos biológicos que favorecieran la oxidación, degradación, transformación y completa la mineralización de distintos contaminantes [73].

Estos métodos de tratamiento biológico están sujetos a la capacidad de los organismos para degradar o reducir los contaminantes orgánicos presentes en el medio ambiente a productos inocuos (dióxido de carbono, agua y biomasa) a través de reacciones bioquímicas, o hasta ciertas concentraciones que no produzcan efectos nocivos ni en el medioambiente ni en la salud humana. Estos procesos han adquirido en los últimos años una gran importancia, por ser procesos de bajo coste y “amigables” con el medio ambiente, en comparación con los procedimientos físicos y químicos tradicionales [73, 74, 75].

Dichos procesos de biorremediación puede tener lugar durante años, ya que para que se lleve a cabo en su totalidad, recuperándose y restaurándose las áreas contaminadas, se ven implicados varios factores como la cantidad de contaminantes, las condiciones ambientales las cuales favorecen la proliferación y la actividad de los organismos que se utilizan, así como la composición de los suelos, la disponibilidad de nutrientes y el grado de contaminación [73].

Entre las distintas técnicas de biorremediación cabe destacar la **bioestimulación**, que es el proceso por el cual la flora microbiana autóctona es estimulada al adicionarse oxígeno, agua y nutrientes minerales, con el fin de facilitar la degradación de contaminantes [75, 76] o la **fitorremediación**, en la cual se emplean plantas para reparar los suelos contaminados por compuestos orgánicos, ya que éstas remueven y son capaces de destruir a los contaminantes, o lo que es lo mismo, restablecer el suelo contaminado para que vuelva a su condición inicial natural con el fin de ser utilizado para el cultivo. Diversos estudios han avalado la capacidad que tienen las plantas y en concreto a la zona rizosférica (zona de la raíz de la planta en contacto con el suelo) en la reducción de distintos contaminantes tales como insecticidas y herbicidas presentes en el suelo [75].

Dado que no todas las plantas realizan los mismos procedimientos bioquímicos para degradar los distintos contaminantes, la fitorremediación se puede clasificar en función de la actividad fisiológica de las plantas al enfrentarse a los contaminantes, teniendo de esta forma plantas capaces de remover contaminantes inorgánicos para posteriormente acumularlos en sus tejidos, (fitoextracción/ fitoacumulación/ fitominería) y plantas que participan en la disminución de los contaminantes de las aguas subterráneas, así las plantas son utilizadas como un “sistema de bombeo” de agua contaminada mediante el proceso de transpiración (fitobombeo) [73].

Por otro lado, existen plantas con la capacidad de liberar enzimas específicas o cofactores enzimáticos que hacen posible que un contaminante orgánico sea transformado o degradado mediante procesos de fitotransformación o fitodegradación [73].

Las enzimas expulsadas por la planta en la rizosfera de las plantas fitorremediadoras, tienen una gran labor en la degradación de los compuestos orgánicos, por ejemplo la dehalogenasa, nitroreductasa, lacasa y nitrilasa son capaces destruir contaminantes de origen orgánico [75].

Distintas plantas han sido utilizadas en la fitorremediación de diclofenaco, como es el caso del álamo, que presenta una gran actividad enzimática, la enzima glutatión-S-transferasa aumentó de forma significativa en las raíces del álamo después de estar sometido a una exposición de diclofenaco, observándose un incremento de la actividad de la peroxidasa ascorbato y glutatión reductasa en la exposición a corto y medio plazo del diclofenaco, esto pone de manifiesto la capacidad que tiene el álamo para la eliminación del diclofenaco en agua [69].

Otros autores como han expuesto la susceptibilidad del diclofenaco a la fotodegradación, en concreto Poirier-Larabie et al [77] vieron una fotólisis rápida de diclofenaco, de modo que solo el 14% de la concentración inicial de diclofenaco permanecía en agua dentro de las 24 horas de la exposición a la luz solar artificial [69, 77].

Al respecto, en otros estudios científicos se señaló que el trigo es capaz de estimular a la enzima tolueno-o-monooxigenasa por su expresión mediante la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y degradar compuestos como el tricloroetileno. Siendo utilizados tanto el trigo como las plantas, caña de azúcar, trébol, arroz, maíz, chícharo, pastos, algodón, alfalfa, tabaco, lino y soya en la fitorremediación de suelos contaminados por compuestos orgánicos como el petróleo y sus derivados [75].

Por ejemplo, estudios llevados a cabo por He Y. et al. han constatado que los metabolitos de ibuprofeno encontrados en *P. australis*, fueron parecidos a los metabolitos encontrados en mamíferos y microbios, sin embargo en los otros trabajos científicos del metabolismo de ibuprofeno realizados en la planta acuática *Lemnagibba L*, un tipo de lenteja de agua, detectaron hidroxibuprofeno y 1,2-dihidroxibuprofeno como intermedios, pero no carboxibuprofeno, por lo que la ruta metabólica que sigue el ibuprofeno en la lenteja de agua era diferente de los mamíferos y microbios, pero similar al metabolismo de los hongos [65].

En general, esos estudios demostraron que la fitodegradación de IBU efectivamente ocurrió dentro de los tejidos de *P. australis* mediante la transformación de IBU en cuatro intermedios [65].

Asimismo, se tiene constancia de la existencia de los intermedios hidroxibuprofeno, tienen relación con una mayor actividad del citocromo P450, de forma que la transformación de IBU a sus respectivos metabolitos es catalizada por el P450 en el retículo endoplasmático, pasando luego por la catalización en el aparato de Golgi, seguido de un metabolismo adicional o un almacenamiento en las vacuolas o paredes celulares, identificándose cuatro posibles intermedios del IBU formados en matrices vegetales, como son hidroxibuprofeno, 1,2-dihidroxibuprofeno, carboxibuprofeno y glucopiranosiloxibuprofeno (conjugado IBU-glucósido) [65].

La presencia de diclofenaco en las aguas, hace que lleguen restos de dicho principio activo a distintos organismos acuáticos, afectando por ejemplo a la integridad de la membrana celular en la lenteja de agua [69, 78] o aumentando el estrés oxidativo específico del tejido de los mejillones [69, 79] de forma que la acumulación del diclofenaco y sus metabolitos se ha documentado en peces, junto con un crecimiento de la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos en los trabajos realizados por Islas-Flores y Guiloski [69].

Se ha encontrado en la bibliografía consultada investigaciones llevadas a cabo sobre el metabolismo del DCL en la planta *Typha latifolia*, demuestran la existencia de diclofenaco sin metabolizar y los metabolitos hidroxidiclofenaco, glucopiranosiloxibuprofeno y conjugatodiclofenaco-glutation en las raíces de la planta y diclofenaco e hidroxidiclofenaco en las hojas [65, 80].

En el caso de la CBZ, como se ha mencionado anteriormente perdura durante mucho tiempo tanto en las plantas de tratamiento de las aguas residuales, como en el medio ambiente, por ejemplo diversas investigaciones han constatado la presencia de carbamazepina en ensayos llevados a cabo con tomates, encontrándose en estas hortalizas cantidades de carbamazepina superiores al 80% de la cantidad total enriquecida de carbamazepina, almacenándose la mayor parte de ella en las hojas de la planta del tomate, de igual manera los estudios científicos dirigidos por Shenker [66, 81] demostraron una captación de carbamazepina por las plantas de pepino en cultivos hidropónicos y en experimentos en invernaderos [66].

Se estudió la absorción de CBZ por la raíz (batata y zanahoria) y hortalizas (tomate y pepino) y se determinaron dos productos de transformación de CBZ: 10,11-dihidro- 10,11-dihidroxi -carbamazepina (DiOH-CBZ) y carbamazepina 10,11-epóxido (EP-CBZ) [66, 82]. La concentración de EP-CBZ fue superior mayor en las hojas de patata dulce y zanahoria que el compuesto original, como se sabe que la CBZ perdura en los suelos durante mucho tiempo, se deduce que este compuesto es absorbido por las plantas [66], en las últimas décadas se tiene constancia de la captación y translocación de CBZ en los cultivos irrigados con aguas residuales tratadas [66, 82].

4. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN

Los bioindicadores son organismos, o comunidades de estos, que mediante su presencia indican el nivel de conservación o el estado de un hábitat [83, 84]. Deben tener una amplia distribución, ser abundantes, sedentarios, estar disponibles todo el año y tolerar las variaciones ambientales, entre ellas niveles diversos de contaminación. Asimismo, deben ser de fácil muestreo, identificación, almacenamiento y conservación para poseer una buena capacidad de bioacumulación neta [83, 85, 86].

El bioindicador ideal es aquel que presenta tolerancias ambientales estrechas [83, 87] es decir, que sea susceptible a las variaciones de los factores físicos y químicos del medio en el que vive, midiendo los efectos de la contaminación en el ambiente y en los propios seres vivos. Es por ello que aportan mucha información sobre los riesgos para los organismos, el ecosistema y para el ser humano [83, 88] pudiendo ser utilizados por sus características como sensibilidad a contaminantes, dispersión, éxito reproductivo y distribución, como estimadores de las condiciones ambientales que resulten difíciles y costosas de medir [83, 89].

El uso de bioindicadores se fundamenta en la suposición de que su presencia o abundancia esté correlacionado con una o muchas variables del ecosistema que le son favorables para su supervivencia; constituyéndose un vínculo entre el bioindicador y las variables que se quiere indicar [83, 90]. Son muy utilizados en estudios dirigidos a evaluar los efectos de la actividad humana a través de la biota, definiendo de forma general el reconocimiento y determinación de los cambios ambientales, naturales o inducidos por el hombre a través de la biota. De esta forma, se asocia a un control cualitativo, es decir la presencia o ausencia de un determinado organismo, o la capacidad de acumulación corporal del elemento [86].

En esta Tesis utilizaremos como bioindicadores, tres variedades de plantas presentes en el Parque Nacional de Doñana, con distinta demanda de agua para su ciclo vital, lo que nos permite tres escenarios distintos de ensayos de exposición. Se seleccionó la *Lavandula dentata*, por ser una planta que se encuentra en casi todos los hábitats, una planta leñosa, que necesita poco agua, la *Salicornia europaea*, que crece cerca de las playas y el *Juncus sp.* que vive en las zonas inundadas.

4.1. LAVANDULA DENTATA

La lavanda es una planta perteneciente a la familia de las *Lamiáceas* y está integrada por unas 39 especies de plantas subarborescentes, perennes y leñosas como la *Lavándula dentata*, *Lavándula stoechas*, *Lavándula lanata*, o *Lavándula spica*, dentro de una amplia gama de altitudes, según la especie, teniendo propiedades antisépticas, antiespasmódicas y tónicas. Generalmente sus flores se utilizan para la elaboración de perfumes y colonias, aunque también se emplean con fines ornamentales y para la obtención de esencias [91, 92].

En el caso de la *Lavandula dentata* (figura 6), tiene entre 60-80 cm de altura. Las hojas son lanceoladas con el borde dentado, sus flores son bilabiadas, de intenso color azules moradas ovadas que se agrupan en largas espigas con su peculiar olor tan característico, con hojas de color verde grisáceo, floreciendo en primavera [91, 93]. Esta especie de lavanda se extiende desde la región Macaronésica, en Cabo Verde, a ambas orillas del mar Rojo, por toda la cuenca Mediterránea occidental, el noroeste de África hasta la Península Arábiga, Etiopía y a ambas orillas del mar Rojo [91].



Figura 6. *Lavandula dentata*.

Crece en sustratos pedregosos, preferentemente calcáreos aunque a veces se extiende en suelos arcillosos o pizarrosos y pobres en humus. Al no ser una planta exigente en cuanto a la cantidad de nutrientes, puede crecer en ambientes secos, por lo que aguanta muy bien la sequía mediterránea [91, 93].

4.2. *JUNCUS SP.*

Pertenece a la familia de las *Juncaceae*, son plantas herbáceas perennes, por lo general son rizomatosas, es decir, poseen rizomas, tallos subterráneos desprovistos de hojas, siendo en muy pocas ocasiones con tuberosos de escaso desarrollo o con tubérculos intercalados en las raíces, glabras. Posee comúnmente unos tallos ascendentes aunque en algunas especies se puede encontrar cilindricos o comprimidos, estriados o sumergidos. Las hojas están diferenciadas en vaina y limbo, muchas especies tienen el limbo cilíndrico hueco o con médula esponjosa, también es frecuente encontrar un limbo plano, semicilíndrico o canaliculado en función de la especie, mientras que las vainas pueden ser, abiertas o cerradas [101].

El género incluye unas 316 especies comúnmente llamados juncos, como *Juncus sp* (figura 7) [102], *Juncus effusus*, *Juncus littoralis*, *Juncus capillaceus*, *Juncus tenuis*, etc. Se encuentran principalmente por las zonas templadas y frías de ambos hemisferios, siendo raro localizarlas en las zonas tropicales [101].

Son plantas acuáticas emergentes, al igual que los carrizos, eneras, etc., es decir, plantas anfibia que viven en aguas poco profundas, arraigadas en el suelo cuyos tallos y hojas emergen fuera del agua, llegando a medir hasta 2 o 3 metros de altura, estas plantas intermedias entre terrestres y acuáticas, se benefician de los medios terrestre y acuático, por lo que no tienen

limitaciones de agua y acceden mejor a la luz que las plantas sumergidas, además están adaptadas para soportar la falta de oxígeno que se produce en el suelo encharcado, al poseer canales de aireación que facilitan el paso del oxígeno de las hojas a las raíces, es por ello que contribuyen a eliminar los contaminantes del agua, eliminando sólidos en suspensión, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y microorganismos patógenos [103].



Figura 7. *Juncus* sp. [102].

4.3. SALICORNIA EUROPAEA

La salicornia es una planta carnosa o suculenta y halófila, es decir, crece en las zonas donde se concentra agua salada; se distribuye en las playas, manglares, marismas, salinas y zonas costeras (es por ello que posee un fuerte sabor salado) [94]. Se encuentra por toda la costa de Europa desde el Ártico hasta el Mediterráneo, en las orillas mar Negro y mar Caspio [95], en África, zonas de América, Arabia Saudita e India [94] también está presente esporádicamente en salinas interiores en toda Europa [95] predominando los cultivos en Holanda y Portugal, por las condiciones climáticas y la solobridad de los terrenos que facilita el crecimiento de esta planta [94].

Los tallos por lo general son leñosos en la parte basal y carnosos-articulados en el resto de la planta, las hojas se encuentran opuestas, soldadas entre sí, formando un cilindro en cuyo borde se observan las láminas foliares reducidas a escamas hialinas agudas [96].

En la *Salicornia europaea*, tiene aproximadamente 35 cm de alto, y está muy ramificada, las ramas más bajas pueden llegar a ser tan largas como el tallo principal, en época de floración posee una flor central más grande que los laterales [97].

Existen varias especies como la *Salicornia europaea*, la *Salicornia ambigua* o la *Salicornia perennis*, entre otras [94]. Perteneciente a la familia de las *Amaranthaceae*, casi todas son bastante pequeñas. Por lo general son plantas herbáceas, constituidas por un tallo horizontal y pequeños tallos laterales erguidos, articulados en nudos y entrenudos (la planta carece de hojas como tal). Los tallos son carnosos y de color verde, volviéndose rojizos al final de su ciclo vital, las “hojas” están reunidas en pequeñas escamas, cuyas flores, que aparecen en otoño, son muy poco aparentes y se presentan generalmente en grupos de nudos de la parte superior de los tallos [95].



Figura 8. *Salicornia europaea*.

La *Salicornia europaea* posee un mecanismo regulador de la salinidad muy eficiente, puesto que sus células son capaces de eliminar el exceso de cloruro de sodio, sin perder agua. Gracias a esta propiedad “administradora de salinidad”, no resulta tan salada, por lo que es altamente comestible, tanto cocida como cruda, (sustituta de la sal). Contiene un alto grado de proteínas y ácidos grasos insaturados además de grandes cantidades de minerales, como calcio, sodio, potasio y yodo, siendo además una fuente importante de fibra, y un alimento prácticamente libre de calorías que favorece la buena hidratación [98, 99]. Por todo ello, en los últimos años se está incorporando con frecuencia en la dieta de deportistas [100].

Hoy en día se ha empezado a utilizar en la producción de biodiesel, a través de su aceite, siendo un combustible tan potente que genera una energía similar a la turbosina (usada en aviones y maquinaria industrial) pero un 80% más limpio que cualquier otro combustible, por lo que podría suponer una fuente de energía orgánica importante para minimizar las emisiones de dióxido de carbono en las industrias y la aeronáutica [98].

5. PARQUE NACIONAL DE DOÑANA

5.1. DOÑANA: ENCLAVE NATURAL

La Reserva Natural de Doñana es un espacio protegido de más de 108.087 Ha que se reparten casi por igual entre las categorías de protección de Parque Natural (53.835 hectáreas) y Parque Nacional (54.252 hectáreas). Está considerado como una de las zonas naturales protegidas más importantes de Europa. Se encuentra en la Comunidad Autónoma de Andalucía, al suroeste de España, entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (figura 9) [104, 105], concretamente en el extremo sureste de la provincia de Huelva, suroeste de la de Sevilla y noroeste de la de Cádiz, al Norte del Estuario del Guadalquivir entre las desembocaduras de los Ríos Guadiana, Tinto y Guadalquivir, siendo el Océano Atlántico su límite sur [106]. Rodeada de 22 núcleos urbanos, con una población total de 185.000 habitantes, Doñana se ve “amenazada” por actividades urbanas, agrícolas, industriales y mineras [107].



Figura 9. Localización del Parque Nacional de Doñana [modificado 108].

Sobre el Espacio Natural de Doñana recae una larga lista de reconocimientos nacionales e internacionales que destacan la importancia de su patrimonio natural y cultural. En reconocimiento de su importancia cultural, científica y paisajística, e incluyendo distintos ambientes naturales que la componen, para su mejor preservación, se crea, mediante el Decreto 2412/1969 de 16 de octubre de 1969, el **Parque Nacional de Doñana** (PND) [104]. Con una extensión de 54.252 Ha es la

mayor reserva biológica de España, ofreciendo un entorno único en Europa para la protección de numerosas especies en peligro de extinción. Está integrado en el Convenio de Ramsar para la protección de los humedales y reconocido por la UNESCO como primera Reserva de la Biosfera y posteriormente ha sido declarado Patrimonio de la Humanidad [104,109].

El nombre Doñana hace alusión a la aristócrata española Doña Ana Gómez de Silva y de Mendoza, hija de Doña Ana de Mendoza de la Cerda, comúnmente llamada princesa de Éboli y, casada con el VII duque de Medina Sidonia, que se retiró a vivir a estas tierras en el siglo XVI, “las tierras de Doña Ana”, de ahí Doñana [110].

5.2. ECOSISTEMAS DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA

El PND presenta una gran variedad de ecosistemas (marismas, playa, dunas móviles, monte, bosque, y lagunas) que contienen una biodiversidad única en Europa, tanto en flora como en fauna. Entre ellos destaca la marisma, que ocupa unas 30.000 hectáreas, inundándose por los arroyos y las aguas de lluvia, formando un perfecto ecosistema para las aves migratorias, tanto europeas como africanas [104, 110].

El PND presenta una amplia flora y fauna, cuenta con más de 800 especies de plantas, 20 especies de peces de agua dulce, 11 de anfibios, 21 de reptiles, 37 de mamíferos no marinos y 360 aves, de las cuales 127 se reproducen habitualmente en el Parque [109, 111]. De entre todas estas especies, varias se encuentran en peligro de extinción, como es el caso del águila imperial ibérica o el lince ibérico, el mamífero carnívoro más amenazado del planeta y que se encuentra solo en el Parque y en la Sierra de Andújar (Jaén) [110, 112].

Aunque el Parque Nacional de Doñana carece de grandes relieves podemos encontrar pequeños desniveles en el terreno que hacen posible la existencia de los distintos ecosistemas y por tanto diferentes hábitats (figuras 10 y 11) [110].

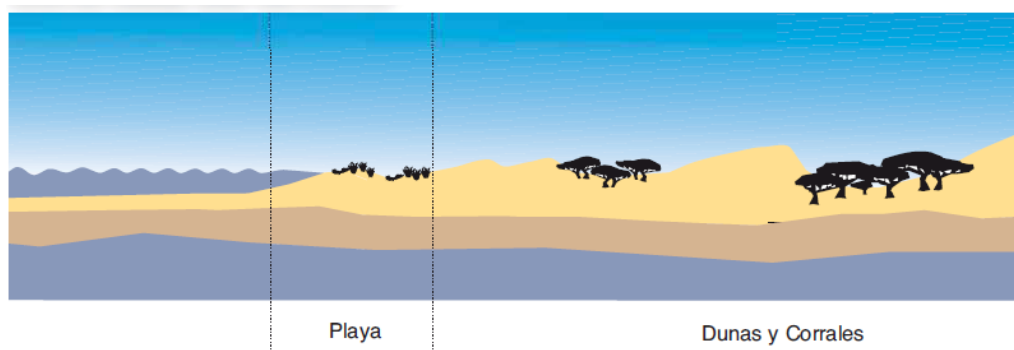


Figura 10. Corte del territorio: playa, dunas y corrales [110].

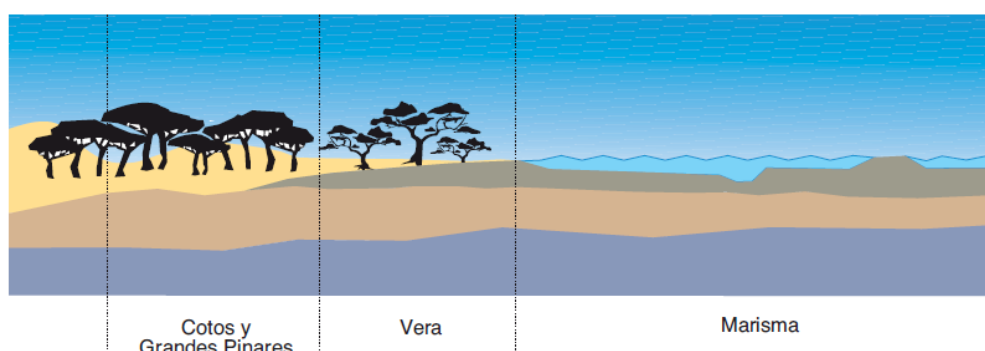


Figura 11. Corte del territorio: marisma, vera, cotos y grandes pinares [110].

Los **bosques de pino y matorral mediterráneo** (en la zona llana del PND) crecen principalmente en un suelo arenoso, mientras que la enorme marisma está constituida por arcillas impermeables cuyo régimen hídrico depende de la estación del año [109], es decir, llenándose de agua en invierno y secándose progresivamente en primavera-verano [104].

Entre los ecosistemas marismeños, cabe destacar la **marisma baja**, que se encuentra por debajo de la altitud media, acumulando una gran cantidad de agua de lluvia, lo que hace que disminuya la salinidad y predomine una vegetación formada mayoritariamente por el bayunco (*Scirpus littoralis*) y las castañuelas (*Scirpus maritimus*) creando el hábitat ideal para la fauna acuática como son los patos reales, cucharas, rabudos, frisos, cercetas, fochas, etc [110].

Cerca del río se pueden encontrar zonas más profundas que permanecen encharcadas durante largos periodos, por lo que estas lagunas presentan una alta salinidad, que dificulta el crecimiento de la vegetación y al secarse forman una costra de sal blanquecina que se deposita sobre la arcilla, formando los «lucios», siendo el más extenso y más conocido el Lucio del Membrillo (figura 12). Este lucio está formado por dunas y pinares. Lo que hace años fueron cauces de arroyos, afluentes

del río y brazos, actualmente se encuentran cubierto de eneas (*Typha latifolia*) y carrizos (*Phragmites australis*) formando caños y creando el ecosistema idóneo para carpas, ranas, gallipatos, galápagos, calamones, avetorillos, martines pecadores, etc [110].



Figura 12. Lucio del membrillo.

La **marisma alta o almajal** se mantiene prácticamente todo el año como una estepa arcillosa y salina, estando sólo encharcada en el invierno, lo que hace que esté poblada por matas y por especies de plantas carnosas como es el majo salado (*Arthrocnemum macrostachyum*) o el almajo dulce (*Suaeda vera*). Es utilizada para la nidificación de grandes colonias de limícolas como las cigüeñuelas, avocetas, alcaravanes, terreras y canasteras [110].

Las **vetas y vetones**, a diferencia de los lucios y caños, son terrenos que se alzan por encima del nivel medio formando pequeñas islas que no se inundan, salvo ocasiones puntuales. Los **paciles**, que suelen encharcarse con más facilidad ya que se encuentran a una altitud está más baja que las vetas y vetones, son el lugar idóneo para la proliferación de las plantas halófilas y por ende para albergar para especies como charrancitos y chorlitejos, siendo frecuentadas en busca de alimento por liebres y ratones silvestres [110].

La **vera** es la franja divisoria entre la marisma y los cotos y dunas, lo que hace posible la coexistencia de la flora y fauna de ambos ecosistemas. En esta zona, el crecimiento de junqueras y pastizales se ve facilitado por la humedad filtrada por las arenas, sirviendo estos vegetales de pasto para ciervos y gamos durante las épocas de sequía. También se localizan en la vera restos de antiguos bosques de alcornoques (*Quercus suber*) conocidos mundialmente como las Pajareras de Doñana ya que hacen factible la existencia de grandes colonias de cría de garza, espátulas, garcillas y martinetes [110].

En los **cotos** (figura 13) predomina la vegetación, en cuyas zonas más altas y secas se encuentran bosques de sabia (*Juniperus phoeniceas sp. turbinata*). La fauna está formada en su mayoría por herbívoros y depredadores como es el caso del ciervo, jabalí, conejo, lirón, comadreja,

turón, meloncillo, gineta, gato montés, etc. Es también el refugio del lince ibérico y del águila imperial [110].

Las zonas de matorral se dividen tres tipos de montes:

-El **monte blanco**, llamado así por el color blanquecino que otorga el jaguarzo (*Halimium halimifolium*) y por varios tipos de jaras [110].

-El **monte mediterráneo**, formado mayoritariamente por plantas aromáticas como el cantueso (*Lavandula stoechas*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus tomentosus*) [110].

-El **monte negro** constituido por los brezos (*Erica sp.*), brecinas (*Calluna vulgaris*) y tojos (*Ulex sp.*) que dominan las zonas más profundas y húmedas, entrelazándose con zarzas (*Rubus gr. ulmifolius*) y torviscos (*Daphe gnidium*). Aquí también se encuentran bosques de pinos (*Pinus pinea*), y lentiscos (*Pistacia lentiscus*) y pequeñas áreas cubiertas por labiérnago (*Phillyrea angustifolia*), retama blanca (*Osyris alba*), retama de escobas (*Cytisus scoparius*) siendo el hábitat ideal para el milano real y el milano negro, águila calzada, críalo, cernícalo, ginetas y meloncillos [110].



Figura 13. Cotos de Doñana.

Las **dunas** (figura 14) tienen su origen en la playa ya que los vientos del Suroeste amontonan pequeños cúmulos de arena alrededor de alguna mata de barrón (*Ammophila arenaria*) u otro obstáculo que los sucesivos aportes harán que la duna pierda su estabilidad, empiece a moverse y a unirse a otras dunas, conformando grandes médanos que avanzan de forma paralela hacia el interior sobre una superficie plana dejando a la intemperie un espacio húmedo y al abrigo del viento que posibilita el asentamiento de plantas [110].



Figura 14. Dunas de Doñana.

Los **corrales** se cubren de pequeños matorrales de clavellinas (*Armeria pungens*) y siemprevivas (*Helichrysum picardii*). Más al interior, los pinares colonizan el corral, junto con las junqueras (*Juncus sp.*), las matas de adelfas (*Nerium oleander*) o los matorrales de jaguarzos y camarinas (*Corema album*) y en esta zona se asienta una gran cantidad de fauna como son las águilas culebreras, los alcotanes, las lechuzas, lince, jabalíes, tortugas, víboras, culebras, conejos o lagartijas [110].

5.3. CONTAMINACIÓN EN EL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA

El PND se sitúa sobre el acuífero Almonte-Marismas, situado entre los ríos Tinto y Guadalquivir, y que ocupa 2.500 Km² entre las provincias de Huelva y Sevilla. El drenaje de dicho acuífero se produce a través del río Guadamar, los arroyos de La Rocina y El Partido situados al NO y las propias marismas. En el entorno del Parque se asienta una población de 185.000 habitantes repartidos en 22 núcleos urbanos [107, 113], que hacen que el PND se vea constantemente amenazado por las actividades urbanas, agrícolas e industriales [107, 114].

Inicialmente, se alimentaba del sistema hidrológico de La Rocina-Madre de la Marisma-Brazo de la Torre, que reunía los aportes fluviales procedentes del NO y del NE [107, 115]. Más tarde se suprimió en gran medida el aporte hidráulico del río del Guadamar, construyendo varios muros y aislando de esta forma, por el sur, la marisma del río Guadalquivir y acotando la entrada de agua a la marisma, por el agua de las lluvias y los arroyos del NO [107].

La noche del 25 de abril de 1998, a unos 50 km al norte del PND, se ocasionó la rotura de uno de los muros de contención de una balsa de decantación que contenía residuos mineros y las aguas ácidas con una gran cantidad de FeS₂ y de metales pesados (Pb, As, Zn y Cu) procedentes de las minas de pirita de los Frailes en Aznalcóllar (Sevilla) [109, 116, 117, 118]. Dichas aguas se precipitaron al río Agrio, afluente del Guadamar, derramándose cerca de 2 Hm³ de lodos tóxicos y

cerca de 4 Hm³ de aguas ácidas, perjudicando a una superficie total de 4.286 hectáreas, con una parte del PND cubierto por los lodos tóxicos y las aguas ácidas [109, 117].

Después de esta catástrofe se aplicó el Plan Doñana 2005, que hizo que la marisma tuviera un funcionamiento hídrico más natural, recuperando los intercambios con el río Guadalquivir y sus afluentes [107, 119] con lo que la marisma dejó de estar aislada intercambiando de forma osmótica aguas con las áreas colindantes, favoreciendo las corrientes de aguas y evitando así que las aguas se estancasen. No obstante, esta nueva situación hizo más vulnerable al PND a la contaminación derivada de las actividades humanas de sus alrededores [107].

Las evaluaciones a las que ha sido sometido el PND desde el accidente de Aznalcóllar, han corroborado, asimismo, la amenaza que supone las prácticas agrícolas y agropecuarias y por tanto el uso de plaguicidas en el entorno de Doñana [104, 107]. El PND se encuentra amenazado por las actividades agrícolas, un motor muy importante en la economía de la zona, pero que afecta al PND en la extracción de agua subterránea para regadíos, el uso de agua superficial para arrozales y en la contaminación defertilizantes y plaguicidas. Siendo probablemente las causantes de la gran cantidad de compuestos nitrogenados que están presentes en aguas subterráneas [104, 107, 113]. En el arroyo de El Partido se han encontrado altos valores de nutrientes (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-}) y metales (Al^{3+} y Cr^{3+}), que pueden ser debidos por el uso de fertilizantes y plaguicidas en Doñana y sus alrededores [107, 120].

También destacan las numerosas almazaras, industrias de procesamiento de uva y vegetales e industrias cárnicas y lácteas de la zona. Los efluentes de estas industrias amenazan a El Partido y al curso bajo del Guadiamar. Otra fuente potencial de contaminación está a 45 Km al NO del PND, en las orillas de los ríos Odiel y Tinto, ya que los Polos Industriales de Huelva cuentan, con industrias de transformación minera, un complejo petroquímico, una central térmica y una fábrica de celulosa, cuyos contaminantes pueden alcanzar Doñana por vía hidráulica o eólica [104, 107, 115, 121, 122].

Es evidente, por tanto, que el área de Doñana es un espacio complejo donde coexisten algunos de los más preciados valores medioambientales con el desarrollo económico y social de las poblaciones circundantes [104].

La calidad de las aguas superficiales que llegan a las marismas del PND ha sido siempre una preocupación por parte de todos los organismos implicados en la conservación de este humedal. Desde los años 90 se realizan periódicamente informes, advirtiendo sobre la mala depuración de las aguas residuales que acaba recibiendo Doñana y el riesgo que implica sobre la calidad del agua de las marismas, efectuando distintos planes de desarrollo sostenible a fin de erradicar este problema que a la par que contamina los arroyos y marismas de Doñana, provoca indirectamente problemas

de eutrofización y contaminación en aguas superficiales y subterráneas. Desde hace unos años se lleva realizando el seguimiento anual de las instalaciones de depuración de las poblaciones del entorno tal y como se define en el *Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, por el que se desarrolla el Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas*, incluyendo en todas las depuradoras de la comarca de Doñana un tratamiento terciario para la eliminación de nutrientes y de esta forma prevenir la eutrofización de los ríos, arroyos y marismas [123].

6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas consiste, en esencia, en la ionización de los átomos o moléculas de una muestra, con mayor frecuencia en modo positivo, para ser separados más tarde en relación a su relación masa/carga (m/z). Esta técnica, combinada con técnicas de separación de alta resolución, es la más específica para analizar muestras complejas reales, ya que permite obtener una gran cantidad de información a partir de los fragmentos iónicos del analito. Posee una elevada sensibilidad, llegándose a la detección de moléculas en cantidades de atomoles (10^{-18} moles) y femtomoles (10^{-15} moles) [124].

La gran versatilidad de esta técnica analítica, permite determinar la estructura de compuestos muy diversos y es aplicable a muestras volátiles, no volátiles, polares, apolares, muestras sólidas, líquidas y gases [124].

La espectrometría de masas (MS) se incorporó en el área del análisis de las biomoléculas a finales de los años 70 con la aparición de distintas técnicas de ionización suave, como la desorción por campo eléctrico (FD), la desorción por plasma (PD) y la ionización por bombardeo con átomos rápidos (*Fast atom bomb bombardment*, FAB), siendo este último un método de ionización suave que surge de la combinación de desorción del analito desde una fase condensada (mezcla de analito sólido + matriz) con su posterior ionización [125, 126]. Fue el primer método de ionización que hizo posible analizar de manera rutinaria por espectrometría de masas moléculas polares [126]. En MS, los iones en fase gaseosa son generados directamente de una solución del analito en fase líquida, como consecuencia, las diferentes formas de vaporización y de ionización del analito se convirtieron en una etapa ligada en el proceso total de análisis por espectrometría de masas. Más tarde, al principio de la década de los años 90, el FAB fue sustituido con la introducción de dos métodos de ionización suave, como el electrospray (ESI) y la desorción por láser asistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI), constituyendo esta última uno de los

pilares fundamentales para el uso de la espectrometría de masas en estudios de proteómica [125, 126].

La espectrometría de masas combinada con técnicas de separación de alta resolución, es la más adecuada hoy en día para abordar el análisis de muestras complejas, y se realiza a través de cuatro etapas:

1. Introducción de la muestra.
2. Ionización de la muestra, es decir, pérdida de electrones o protones para convertir los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa.
3. Separación y análisis, según su relación m/z , tanto de los iones moleculares como de los fragmentos cargados producidos.
4. Obtención del espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y/o fragmentos separados respecto a la relación masa/carga. La información de dicho espectro es principalmente cualitativa, como la determinación de la masa molecular o la información sobre la estructura a partir de los fragmentos obtenidos, pero también se pueden llevar a cabo análisis cuantitativos mediante el uso de patrones internos o externos con límites de detección que van de los picomoles a los femtomoles [124].

La señal correspondiente a un determinado ión aparece en forma de varios picos que pertenecen a la distribución estadística de los distintos isótopos del ión [124], siendo el ión molecular (M^+) el pico de mayor peso en el espectro que representa normalmente la molécula “padre” menos un electrón y ofrece la información más valiosa en el espectro de masas, ya que su masa y composición elemental indican los límites dentro de los cuales se tienen que encontrar los fragmentos estructurales que se detecten en el espectro de masas [124, 127].

Dependiendo del tipo de instrumento, del método de ionización y de su capacidad para aplicar el barrido de potencial, las características de los espectrómetros de masas varían en cuanto a su poder de resolución, sensibilidad y exactitud en la medida de la masa, ya que ningún instrumento otorga simultáneamente las mejores prestaciones [124]. El análisis de la información del espectro de masas implica reagrupar de forma teórica los fragmentos para reconstituir la molécula original [127].

El **analizador** constituye el núcleo de un espectrómetro de masas, y su finalidad es separar los iones en función de su relación m/z y enfocar los iones separados hacia un punto concreto, de forma que el movimiento de las partículas cargadas permite distinguir unas de otras en función de

la energía cinética de cada ión, de la velocidad o del momento de fuerzas [124]. Existen distintos analizadores, los más empleados para el análisis de biomoléculas son los de **sector magnético, de cuadrupolo, de trampa de iones, de trampa de iones lineal, de tiempo de vuelo o de resonancia iónica en ciclotrón**, cuya elección varía según su resolución en el intervalo de masas que permite separar, de la exactitud de las masas que es capaz de separar, del intervalo dinámico o lineal, de la velocidad de barrido, de la sensibilidad, de la eficacia y de su adaptabilidad, es decir, la posibilidad de poder utilizar distintos modos de ionización. En algunas ocasiones hay que recurrir al acoplamiento de dos analizadores dado que en muchos casos no es posible disponer de un analizador que dé respuesta a las expectativas analíticas deseadas para muestras complejas [124].

El **analizador de trampa de iones** (figura 15) permite el confinamiento de iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos (*Paul trap*, *Orbitrap*) o magnéticos (analizador de resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR). Este analizador almacena, selecciona y analiza los iones formados en la misma trampa o en fuentes de ionización externas [125]. El espacio donde quedan atrapados los iones está definido por las superficies hiperbólicas de tres electrodos: un anillo circular central y dos tapas laterales con pequeños agujeros en el centro para la entrada de iones a la fuente y su posterior salida al detector [125, 128].

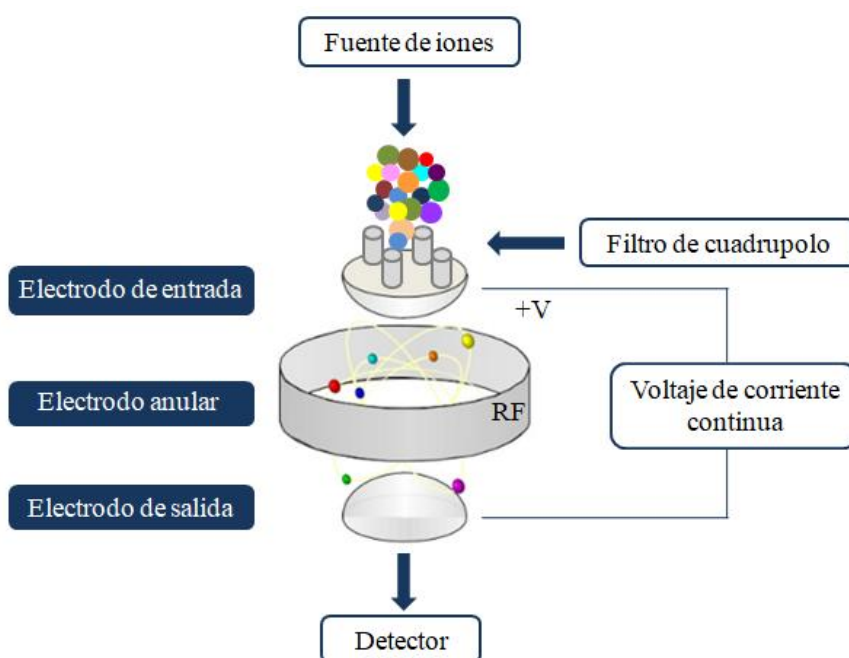


Figura 15. Analizador de trampa de iones.

En el **analizador de trampa de iones lineal**, el confinamiento de los iones, puede llevarse a cabo en sistemas de cuadrupolo provistos en los extremos de sus barras de unos electrodos terminales con la misma geometría, pero más cortos y aislados eléctricamente, de forma que estos electrodos se les aplica un potencial que actúa como una barrera para los iones atrapados en su interior. Además la trampa de iones lineal puede utilizarse como un cuadrupolo convencional, lo que le permite trabajar en cualquiera de los modos de espectrometría de masas en tándem posibles en este tipo de instrumentos (barridos de precursores, pérdidas netas y de iones de producto), aparte de los modos propios de la trampa [125].

El **analizador Orbitrap** fue desarrollado y patentado por Makarov a finales de los años 90 [125, 129] y está formado por dos electrodos (uno tubular externo y un filamento interno-coaxial) atrapando los iones en el campo electroestático formado entre ellos. El filamento interno se ha convertido en una barra en forma de huso, adquiriendo las paredes del cilindro que lo contiene la misma forma [125, 130] es por ello que los iones al ser introducidos de forma perpendicular en este sistema alcanzan un movimiento radial alrededor del huso coordinado con un movimiento axial periódico cuya frecuencia es una función de su valor m/z . Por otro lado, el electrodo externo está dividido en su centro y perpendicularmente en dos mitades, lo que hace que el movimiento periódico de los paquetes de iones de un lado a otro de la cavidad impulse entre estas dos mitades una señal imagen cuya frecuencia es medible para determinar el correspondiente valor m/z . Sin embargo, en la práctica, la señal registrada es una señal compleja o interferograma creada por la combinación de las señales sinusoidales de distintas frecuencias (m/z) e intensidades (abundancia) de cada uno de los iones, pero la aplicación de la transformada de Fourier a esta señal permite determinar la frecuencia derivada de cada uno de los iones y adquirir el espectro de masas [125].

El **analizador de cuadrupolo** (figura 16), consiste en cuatro barras paralelas, a las que se aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crean en su interior un campo llamado cuadrupolar. De esta forma, los iones producidos en la fuente atraviesan de forma longitudinal el recinto limitado por estas barras para incidir en el detector [126]. Los iones que entran en el analizador a una energía de unos pocos electrovoltios, son sometidos al efecto del campo cuadrupolar que los hace oscilar y los desvía en función de su valor m/z , de modo que para una mezcla de potenciales que hace que sólo los iones en un estrecho intervalo de valores m/z lleguen a incidir en el detector [125].

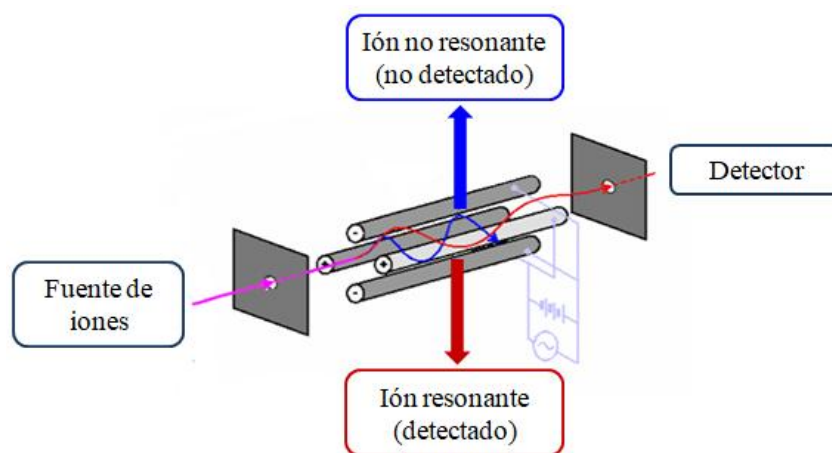


Figura 16. Analizador de cuadrupolo [modificado 131].

El **analizador TOF** (figura 17) se basa en la aceleración de iones gracias a un campo eléctrico, adquiriendo distintas velocidades según el valor de su relación m/z , tardando distinto tiempo en recorrer una longitud determinada, sin que los iones estén bajo la presencia de un campo eléctrico y/o magnético. Así, al ser constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente, la medida del tiempo de vuelo facilita establecer de manera muy exacta la masa de cada uno de estos iones [125]. Por tanto este tipo de analizadores presenta una alta resolución y exactitud de la determinación de la masa, alcanzando valores del orden de partes por millón, lo que hace que sea uno de los analizadores más sencillos y utilizados en día en los laboratorios [124].

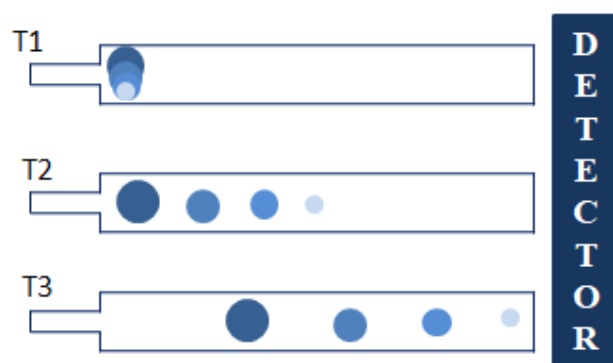


Figura 17. Analizador de tiempo de vuelo [modificado 124].

En cuanto a la **ionización de la muestra**, esta se puede llevar a cabo de varias formas:

El **impacto electrónico** (*Electron Impact*, EI) o Ionización electrónica (*Electron Ionization*, EI) es un método clásico de generación de iones en espectrometría de masas. El analito se

introduce en la fuente, que se encuentra a un vacío de menor de 10^{-6} mbar para más tarde ionizarse por colisión con un flujo de electrones a 70 eV, generado por emisión térmica de un filamento caliente (de tungsteno o renio) [126].

La **ionización química** (*Chemical Ionization*, CI) es un método de ionización relativamente suave. Fue el primer método de ionización empleado en espectrometría de masas. La ionización se ve afectada por reacciones de la molécula con iones de un reactivo gaseoso generados por medio de ionización de impacto electrónico (EI) [126].

La **ionización por electrospray** (*Electro spray ionization*, **ESI**) es, probablemente, el método de ionización más desarrollado y empleado en espectrometría de masas debido a su gran capacidad de ionizar moléculas altamente polares, así como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos. Se lleva a cabo a presión atmosférica y temperatura ambiente, mientras que los otros métodos usan altas temperaturas. El proceso general de electrospray se produce en la punta de un capilar o aguja, de forma que una disolución acuosa, ácida o básica (en función de la muestra), que presenta conductividad eléctrica, es micronizada desde la punta del emisor en el que se aplica un potencial de 3-4 kV, con lo que el líquido que empieza a salir por la aguja, incrementando su carga y adquiriendo una forma cónica denominada “cono de Taylor”. En la punta del cono el líquido cambia de forma a una línea fina, volviéndose inestable al ser forzado a retener más y más carga, llegando a un punto crítico, en el que donde no puede soportar más carga eléctrica, con lo que se dispersa la solución en forma de niebla de pequeñas gotas (menores de $10\mu\text{m}$ de diámetro), altamente cargadas, que vuelan buscando una superficie de carga contraria [126].

Los sistemas de cuadrupolo o de sectores filtran en cada momento grupos de iones dentro de un pequeño rango de valores m/z eliminando el resto de la población de iones, mientras que el analizador TOF separa y detecta en una escala (tiempo de vuelo) el conjunto completo de los iones procedentes de la fuente, de ahí que el sistema trabaje en un régimen discontinuo y por tanto sea un detector indicado para técnicas de ionización de carácter pulsante como el MALDI [125].

El acoplamiento del TOF a fuentes de iones de producción continua, como el ESI, se lleva a cabo mediante sistemas de confinamiento de iones intermedios que, mediante campos eléctricos, acumulan e inyectan, perpendicularmente a la trayectoria inicial, paquetes de iones en el analizador en ciclos con frecuencia del orden del KHz. El TOF es un analizador relativamente simple, barato, con un ciclo de barrido rápido y con un rango de masas, aparentemente, ilimitado [125, 132].

7. ENZIMAS: ESTRUCTURA Y MODO DE ACCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, son sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad sin alterar el equilibrio de dichas reacciones ni el balance de energía, solo aceleran el procedimiento que espontáneamente podrían producirse, puesto que la transformación de reactivo a producto no es directa, sino que hay un paso intermedio en el que el reactivo se activa y sus enlaces se debilitan, llamado complejo activado, siendo necesaria una energía de activación para llegar a dicho complejo. Prácticamente todas las funciones de la célula requieren directa o indirectamente la presencia de enzimas para que ocurran a una velocidad adecuada las reacciones químicas que en definitiva son las responsables de esas funciones [133, 134, 135].

Las enzimas son proteínas, las proteínas están formadas por aminoácidos unidos unos a otros por enlaces peptídicos, estos aminoácidos pueden tener distintas cadenas laterales dependiendo de la carga o polaridad que presenten a pH fisiológico, siendo grandes o pequeñas, ácidas o básicas, hidrofílicas o hidrofóbicas [134, 136].

En todas las reacciones bioquímicas catalizadas por las enzimas, se produce la unión de la enzima del sustrato (sustancia sobre la cual actúa la enzima), formando de esta forma el complejo enzima-sustrato, necesario para que la reacción se lleve a cabo, este complejo también puede reducir la energía de activación al plegar las moléculas de sustrato de tal manera que se facilite el rotura de enlaces, lo que ayuda a llegar al estado de transición, representado por la ecuación [134, 137, 138].



Donde E es la enzima, S el sustrato o reactivo, P el producto de la reacción y ES el complejo intermedio enzima-sustrato, en la figura 18 se muestra el esquema de formación del complejo enzima-sustrato [134, 137].

A diferencia de los catalizadores inorgánicos las enzimas catalizan reacciones específicas, actuando sobre una sustancia llamada sustrato, catalizan un solo tipo de reacción actuando casi siempre sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos [134, 137].

El centro activo es la región muy pequeña del volumen total de la enzima que se une al sustrato siendo específico y exclusivo de cada enzima [134, 138]. El cual obtiene sus propiedades de los aminoácidos que lo conforman, la posición que adquieren los aminoácidos en el espacio tridimensional dan forma, tamaño, comportamiento químico del sitio catalítico (formado por los

aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción), facilitando la unión de la enzima con el sustrato o sustratos, ya que se genera un hueco en el que encaja el sustrato y los aminoácidos que tienen radicales con afinidad química por el sustrato quedan cercanos por los repliegues de la cadena polipeptídica (aunque se localizaran lejos en la cadena original) atrayendo y creando enlaces débiles con el sustrato, cuando se rompen estos enlaces, los productos se separan del centro activo, de forma que la enzima puede comenzar de nuevo el ciclo de reacción [134, 138].

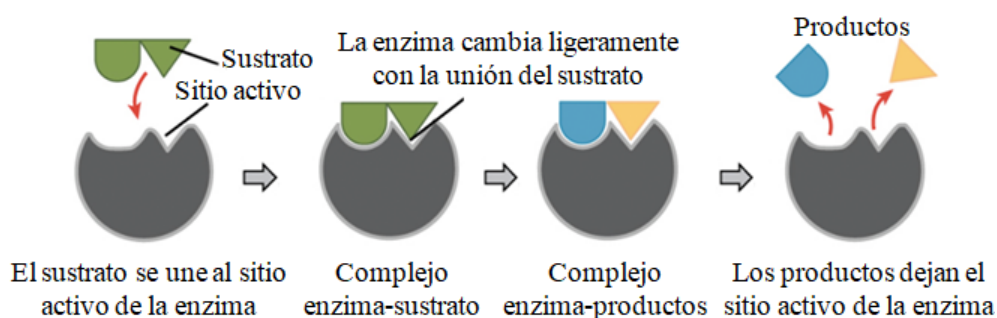


Figura 18. Formación del complejo enzima-sustrato [modificado 139].

La coincidencia entre el sustrato y el sitio activo de la enzima no se debe solamente a la correspondencia de dos piezas como si se tratase de un rompecabezas (modelo llamado “llave y cerradura”), en realidad la enzima modifica ligeramente su forma, produciendo un cambio conformacional, cuando se une al sustrato, dando lugar aún ajuste más preciso, llamado ajuste inducido [138].

Algunas enzimas aceleran las reacciones químicas al acercar dos sustratos entre sí con la orientación correcta, otras crean un ambiente dentro del sitio activo que es favorable para la reacción y otras muchas disminuyen la energía de activación al formar parte de las reacciones químicas, esto quiere decir que los residuos del sitio activo favorecen la formación de los enlaces covalentes temporales con las moléculas del sustrato como parte del proceso de reacción [134, 137, 138].

En todos los casos al finalizar la reacción, la enzima vuelve a su estado, no se queda unida a las moléculas con las que están reaccionando, de hecho una propiedad característica de las enzimas es que no son alteradas por las reacciones que catalizan, cuando una enzima termina de catalizar una reacción, solo libera el producto (o productos) y queda lista para el siguiente ciclo de catálisis, de forma que una sola molécula de enzima es capaz de transformar en producto, en sucesivos ciclos catalíticos, a un gran número de moléculas de sustrato [134, 139].

Las enzimas se encargan de disminuir la energía de activación, es decir, la cantidad de energía que se debe agregar o suministrar a una reacción para que esta comience, llegando así más fácilmente al complejo activado permitiendo que la reacción se realice, ya que sin la presencia de la enzima no sería posible alcanzar el estado de transición, un estado inestable por el que deben pasar los reactivos para convertirse en productos [134, 138, 139].

Las enzimas se clasifican en seis grupos, cuyos nombres se complementan con el sufijo-asa, según el nombre del sustrato con un término que describe la reacción que catalizan, teniendo de esta forma las enzimas hidrolasas, isomerasas, ligasas, liasas, oxido-reductasas y transferasas [134, 138].

-Hidrolasas: Son las responsables de catalizar las reacciones de hidrólisis, extrayendo los enlaces de átomos de nitrógeno y carbono o de oxígeno, es decir, ruptura de los enlaces por adición de agua, a esta clase pertenecen las enzimas digestivas, dentro de estas enzimas existen proteínas como la *tripsina*, la *quimiotripsina* y la *pepsina* fundamentalmente para el proceso digestivo [138, 139].

-Isomerasas: Catalizan las reacciones en las cuales un isómero se transforma en otro, o lo que es lo mismo, transferencia de un grupo dentro de la misma molécula [134, 138].

-Ligasas: A diferencia del resto, en vez de romper enlaces, catalizan la unión de moléculas, produciéndose la formación de enlaces mediante reacciones de condensación [134, 138].

-Liasas: Actúan de forma directa sobre los enlaces, es decir, catalizan las reacciones en las que se eliminan grupos, para formar o añadir un doble enlace, como son las enzimas descarboxilasas, hidratasas, deshidratasas o desaminasas [138].

-Óxidorreductasas: Catalizan las reacciones de redox, facilitando la transferencia de electrones de una molécula a otra, como por ejemplo la deshidrogenasa alcohólica que cataliza la oxidación de etanol y de otros alcoholes [138].

-Transferasas: Catalizan la transferencia de un grupo de moléculas de una sustancia a otra, actúan en diversos sustratos transfiriendo grupos amino, carbonilo, carboxilo, fosforilo, metilo y acirilo. Es el caso de la transmetilasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de una molécula a otra [138].

7.1. COFACTORES

Todas las enzimas son proteínas globulares (salvo las ribozimas) pudiendo estar formadas exclusivamente por cadenas polipeptídicas o contener además otro grupo no proteico. Según la estructura que presentan las enzimas se puede diferenciar entre las holoproteínas, enzimas formadas solamente por polipéptidos y las haloenzimas formadas por la unión de una parte polipeptídica (o apoenzima) y una parte no polipeptídica o cofactor [138, 142].

La apoenzima es la parte proteica que proporciona la estructura espacial específica permitiendo la unión a los sustratos, mientras que el cofactor (o coenzima) forma la parte no proteica encargada de llevar a cabo la reacción enzimática, estos pueden ser inorgánicos u orgánicos de bajo peso molecular como las vitaminas del grupo B, mientras que los cofactores inorgánicos favorecen la actividad catalítica de la enzima, sin su presencia la enzima no actuaría, es por ellos que también se les denomina activadores, como son los iones metálicos como el Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , etc. [134, 138, 142].

8. INHIBIDORES ENZIMATICOS

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a las enzimas para disminuir su actividad, ya que esta no es siempre biológicamente útil y puede tener consecuencias fatales para el organismo, como es el caso de numerosos tratamientos clínicos fundamentados en la inhibición enzimática, muchos antibióticos y otros fármacos reducen o eliminan la actividad de enzimas específicas, por ejemplo la aspirina inhibe la primera enzima de la síntesis de las prostaglandinas. De ahí que la naturaleza haya desarrollado un gran número de inhibidores enzimáticos que frenan o la anulan por completo la actividad enzimática [134, 138].

El inhibidor al unirse con la enzima bloquea la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima, impidiendo que se realice la reacción catalítica correspondiente, dicha unión puede ser reversible o irreversible [134]. Hay casos en los que se puede producir un efecto alostérico, es decir, que el inhibidor se una a otro sitio que no es el sitio activo de la enzima, dicha unión del inhibidor con el sitio alostérico hace que cambie la conformación de la enzima, incrementando o reduciendo la velocidad de unión al sustrato [138].

La validez de un inhibidor enzimático viene determinada por su especificidad (carencia de unirse a otras proteínas) y su potencia (su constante de disociación, la cual indica la concentración necesaria para inhibir una enzima) [138].

Los inhibidores irreversibles reaccionan con la enzima de forma covalente, es decir, modificando la estructura química de la enzima quedando alterado el nivel de residuos de aminoácidos necesarios para la actividad enzimática. Mientras que los inhibidores reversibles se unen a la enzima de forma no covalente (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos) Los enlaces débiles múltiples que se producen entre el inhibidor y el sitio activo se combinan para producir una unión fuerte y específica [134, 138].

8.1. TIPOS DE INHIBIDORES REVERSIBLES

Se pueden distinguir tres tipos de inhibiciones reversibles según el efecto producido por la variación de la concentración del sustrato y si el inhibidor se une a la enzima, al complejo enzima-sustrato o a ambos [138].

-Inhibición competitiva (figura 19): El sustrato y el inhibidor compiten por el sitio activo, ambos tienen una estructura similar y presentan la misma afinidad por el sitio activo de una enzima, pero no se pueden unir a la misma enzima al mismo tiempo [138, 139].

Este tipo de inhibición se puede superar con concentraciones altas del sustrato, dejando así fuera de competición al inhibidor [138, 139].

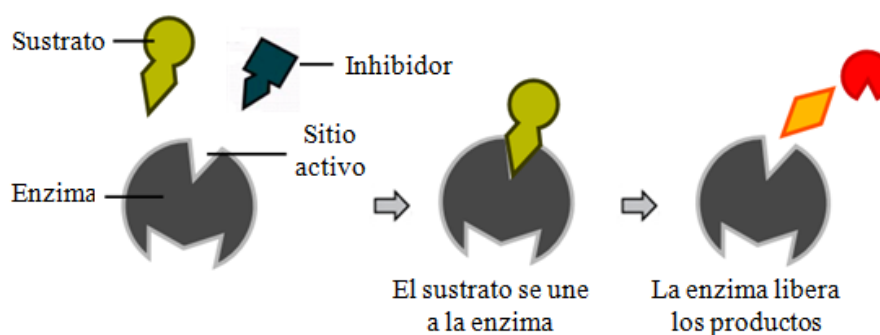


Figura 19. Reacción de inhibición competitiva [140].

-Inhibición acompetitiva: Es un tipo de inhibición no competitiva, el inhibidor no presenta afinidad por la molécula de enzima libre, solo se une al complejo enzima-sustrato (ES), inhibiéndole para continuar el proceso y formar el producto. [134, 138].

-La inhibición no competitiva (figura 20): El inhibidor se une a la enzima libre y compete con el sustrato por la ocupación del sitio activo, se unen a la enzima en puntos distintos al centro

activo, su unión incapacita a la enzima para desarrollar su acción catalítica y en este caso, el aumento en la concentración de sustrato no revierte la inhibición, con lo que el grado de inhibición depende solamente de la concentración de inhibidor [134, 138].

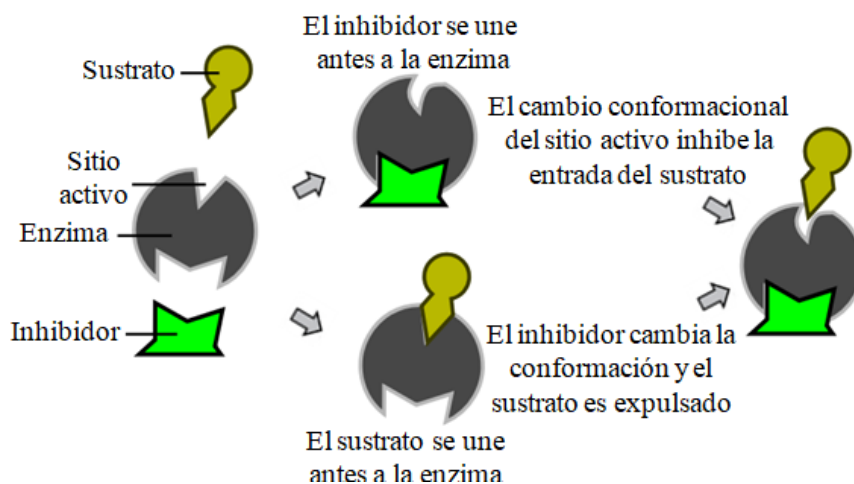


Figura 20. Reacción de inhibición no competitiva.

9. ENZIMA COLAGENASA

Las enzimas proteolíticas son responsables de la hidrólisis de enlaces peptídicos y proteínas, se clasifican en dos grupos, las exopeptidasas actúan sobre los enlaces peptídicos de los extremos de la cadena y las endopeptidasas que actúan en el interior de la cadena, desarrollando una función degradativa dirigida a la matriz extracelular y se agrupan según el residuo catalítico primario que poseen, dentro de las cuales se encuentran las metaloproteinasas (MMPs), que se caracterizan por poseer un átomo metálico como residuo catalítico primario. A esta familia es a la que pertenece la enzima collagenasa ya que presenta un átomo de Zn^{+2} en el centro catalítico [148, 149].

La collagenasa actúa principalmente en la piel humana, aquí se evidencia un aumento de producción de MMPs, como ocurre en la reparación de la dermis, tratar quemaduras y úlceras, eliminar tejido de cicatrices y trasplante de órganos [150].

De igual manera se ha demostrado que tanto la collagenasa promueven la proliferación y migración de los queratinocitos y fibroblastos, así como para la destrucción de tejido muerto o la creación de una nueva matriz extracelular [151].

Las colagenasas son proteínas que degradan colágeno en su conformación nativa de triple hélice bajo condiciones fisiológicas, es decir, participan en los procesos fisiológicos de los que depende la integridad del colágeno o su reordenamiento, tiene la capacidad de romper los enlaces peptídicos de colágeno en un pH fisiológico neutro originándose en un único punto de la triple hélice próximo al extremo N-terminal, produciendo dos fragmentos, uno del 75% de la longitud del colágeno y otro de un 25% [152], por lo que estas enzimas ayudan a crear colágeno mediante la escisión de pro-colágeno, precursor de colágeno, una vez que es secretada por la célula [152, 154].

Están formadas en su mayoría de colágeno intersticial de tipos I y III, presentes en la dermis, siendo el colágeno la proteína fibrilar más abundante en el organismo humano, al formar una parte vital de la matriz extracelular de los animales en carne y tejido conectivo en el cuerpo [154]. De forma que la colagenasa tipo I escinde los extremos terminales de la cadena de colágeno, mientras que la colagenasa tipo II fragmenta el interior de la cadena [155].

9.1. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA COLAGENASA: SITIO ACTIVO

En la piel humana se han identificado tres colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) capaces de iniciar la degradación del colágeno fibrilar de tipo I, siendo la colagenasa intersticial MMP-1, la primera enzima descubierta de la familia de las MMP que se definió por su capacidad de romper las triples hélices de colágeno que son resistentes a la mayoría de las proteasas [154].

La colagenasa intersticial degrada los colágenos tipo I, II, III, VII y X (pero no degrada al colágeno tipo IV y V) a un pH y temperatura fisiológica la enzima cataliza una única escisión a tres cuartos de distancia del extremo amino terminal en cada una de las tres cadenas polipeptídicas que comprenden la triple hélice, monómero nativo de colágeno [154].

Como se ha mencionado anteriormente la enzima colagenasa ya que presenta un átomo de Zn^{+2} en el centro catalítico, el cual al ser el compuesto más abundante en las células, posee un papel primordial en el funcionamiento de más de trescientas enzimas que estabilizan la doble hélice de ADN e interviene en el control de la expresión de los genes haciendo que las MMPs intervengan en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo, capaces de degradar la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo. Todas ellas contienen un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico amino terminal que contiene el sitio fijador de cinc [154, 156].



Figura 21. Estructura de dominio de MMP [modificado 154].

Las MMPs tienen como sustratos a las proteínas de la matriz extracelular (MEC), de forma que mediante la activación de una molécula de unión al cinc, rompen los sustratos de las proteínas de dicha matriz, ya que estas tienen la capacidad de eliminar proteínas dañadas y de degradar componentes de la MEC, esta actividad enzimática está regulada en todo momento por inhibidores endógenos (TIMPs) [149, 154].

9.2. INHIBIDORES DE LA ENZIMA COLAGENASA

Se han desarrollado diversos inhibidores sintéticos capaces de inhibir las MMPs, la clase de compuestos a base de ácido hidroxámico (hidroxamatos) han sido los más estudiados, debido a que su grupo de ácido hidroxámico (CONHOH) actúa como ligando bidentado con el ión zinc que se encuentra en las MMPs, lo que permite una interacción mucho más fuerte con el receptor en comparación con otra clase de inhibidores [157]. En concreto de Catphepsin K (Cat K), es una proteasas de cisteína y un fármaco suministrado para los trastornos esqueléticos, conocido por su potente actividad de colagensa y elasta, la formación de complejos oligoméricos de CatK en presencia de glicosaminoglicanos está asociada con la actividad colagenasa, los inhibidores que interrumpen estos complejos pueden bloquear de forma selectiva la actividad de la enzima colagenasa sin obstruir las actividades proteolíticas reguladores de la enzima [158].

10. ENZIMA TIROSINASA

La tirosinasa es una enzima cuprífera perteneciente al grupo de las monooxigenasas presente en tejidos de plantas, animales y humanos que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina), reacción que convierten a esta enzima clave para la producción de la pigmentación de la piel, la melanina y el color negro de ciertos vegetales pelados cuando son expuestos al aire: La coloración es debido a la conversión química de la tirosinasa en melaninas que son los pigmentos intensamente coloreados [143, 144].

La melanina es un pigmento producido en las células por la acción de la tirosinasa que transforma sucesivamente el reactivo inicial (el aminoácido L-Tirosina) en serie de intermediarios (L-DOPA) para terminar formando la melanina, como resultado se forma la eumelanina (responsable del color marrón/ negro) o se produce la feomelanina (responsable del color amarillo/ rojo) que se consigue mediante una vía metabólica alternativa [143].

La melanina se genera en los melanocitos, que se encuentran en diferentes lugares del cuerpo, principalmente en el pelo y en la piel (en la capa basal de la dermis) y es acumulada en los melanosomas, aunque según las especies las tirosinasas son distintas en términos de sus propiedades estructurales, distribución de tejido y ubicación celular [143, 144]. Este pigmento es el producto final de la melanogénesis, mecanismo conocido para prevenir el daño de la piel causado por la radiación ultravioleta (UV) [143].

Esta enzima regula la cantidad de melanina producida puesto que su acumulación excesiva produce algunos desórdenes en la piel, como son las manchas de la edad o las manchas solares, la enzima es también la responsable del albinismo, (producto de los cambios u alteraciones de los genes que aportan información genética en la enzima, una anomalía en uno de estos genes, hace que la enzima tirosinasa no funcione correctamente, produciendo una disminución de la melanina y provocando por tanto el albinismo) [143, 144].

Otras enzimas solo modifican el tipo de melanina que es sintetizada en la ruta bioquímica de la pigmentación, es por ello que su inhibición se ha convertido en una de las estrategias más importantes para el desarrollo de nuevos agentes despigmentantes, teniendo una gran importancia en los productos médicos y cosméticos, de ahí que sea una enzima muy estudiada en los últimos años [144].

10.1. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA TIROSINASA: SITIO ACTIVO

El sitio activo de la tirosinasa presenta dos átomos de Cu^{+2} , con un índice de coordinación 5, (figura 22) que se une a la azote de los residuos de histidina. En la figura 23 los puntos rojos representan los átomos de Cu^{+2} [145].

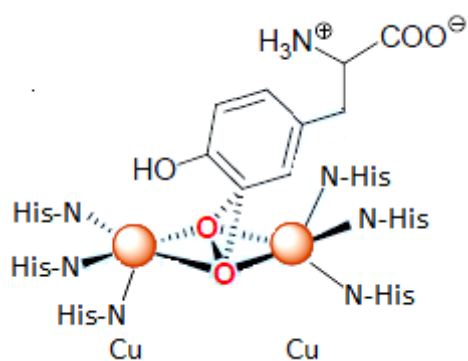


Figura 22. Coordinación del sitio activo de la enzima tirosinasa [145].

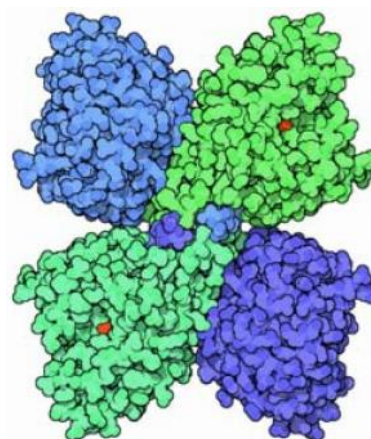


Figura 23. Estructura de la enzima tirosinasa [145].

La tirosinasa cataliza dos pasos de la misma reacción para formar la melanina:

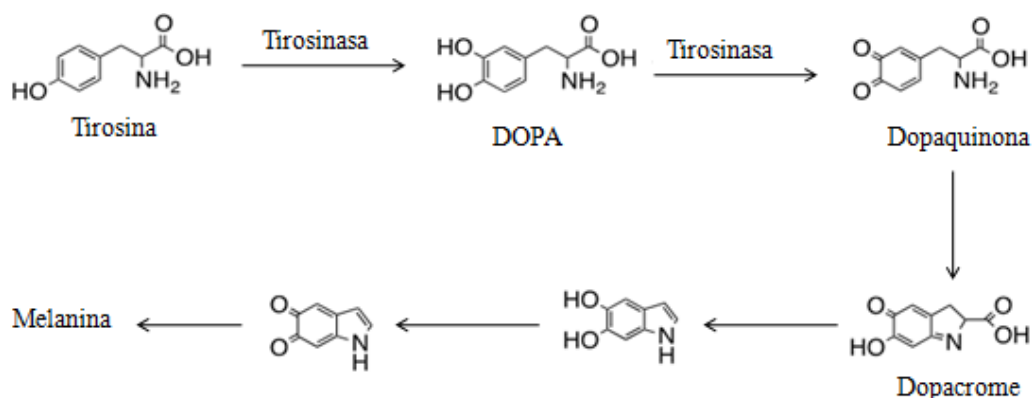


Figura 24. Reacción simplificada para la formación de melanina [modificado 143].

10.2. INHIBIDORES DE LA ENZIMA TIROSINASA

La enzima tirosinasa ha sido aislada de diferentes fuentes, por ello también varias fuentes naturales han sido utilizadas en la obtención de compuestos con inhibición contra la enzima. Entre los grupos fundamentales se encuentran los hongos, bacterias y plantas. Dentro de los inhibidores de la enzima tirosinasa conocidos a día de hoy, encontramos los inhibidores aislados a partir de hongos, como el ácido azelaico o el ácido kójico y los inhibidores derivados de la hidroquinona, como el arbutin [146, 144].

El ácido azelaico (ácido 1,7-heptanodicarboxílico, AZA) es un compuesto natural de cadena lineal y saturado producido por la levadura *Pityrosporum ovale*. No se conoce con exactitud su mecanismo de acción despigmentante, inhibe la enzima tirosinasa [146] mostrando un efecto citotóxico en los melanocitos humanos [144].

El ácido kójico, [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-g-pirona], es un metabolito de champiñones producido por algunas especies *Aspergillus*, y *Penicillium*, es un buen agente quelatante de los metales de transición como el cobre y un buen removedor de radicales libres. Inhibe la tirosinasa de varias especies de champiñones por quelación del cobre del sitio activo de la enzima, muestra una inhibición competitiva con la L-Tirosina y no competitiva con el L-DOPA [147].

La arbutina es un beta-glucósido natural de la hidroquinona que inhibe la tirosinasa de forma competitiva y reversiblemente sin llegar a afectar al proceso de transcripción del ARNm de los melanocitos cultivados de humanos a concentraciones no tóxicas. Ocurre naturalmente en las especies *Arctostaphylos*, *Vaccinus*, *Pyrus* y *Lathyrus*. Este compuesto también inhibe la maduración de los melanosomas y es menos tóxico a los melanocitos en comparación con la hidroquinona. A pesar de la seguridad de la arbutina como agente para blanquear la piel y aminorar las lesiones hiperpigmentadas, algunos trabajos no confirman sus efectos en ensayos clínicos [144, 147].

Además de los inhibidores mencionados hasta ahora, cabe destacar los inhibidores farmacéuticos, como el captopril un antidepresivo antihipertensivo [(2S)-1-(3-mercapto-2-metilpropionil)-L prolina] capaz de prevenir la formación de melanina, ejerciendo su efecto inhibidor por quelatación de los iones de cobre en el sitio activo de la tirosinasa. A parte del proceso de la inhibición está involucrado en la reacción de intercambio de disulfuro entre el captopril y el dominio enriquecido de cisteínas en el sitio activo de la enzima [147].

El metimazol (1-metil-2-mercaptoimidazol) es un fármaco anti-tiroides, inhibe la actividad de la tirosinasa de champiñón de dos formas: conjugando con las o quinonas, lo que provoca inhibición aparente en la formación de productos pigmentados, y quelante de cobre en el sitio activo de la enzima [147].

Los flavonoides también son inhibidores competitivos de la enzima tirosinasa por su capacidad para quelatar el cobre del sitio activo de la enzima, lo que origina una inactivación irreversible de la enzima, aunque estos compuestos son menos activos que el ácido kójico [144].

11. ENZIMA ELASTASA

La elastasa, es una enzima serina proteasa [166] que se encuentra en el jugo pancreático y cataliza la hidrólisis de elastina [152], una proteína que forma las fibras elásticas y ayuda a mantener la piel flexible pero rígida que le permite realizar actividades normales como el doblar un músculo [166].

11.1. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA ELASTASA: SITIO ACTIVO

El sitio activo (figura 25) es una hendidura en el cual se sitúa el sustrato para formar el complejo enzima-sustrato, esta enzima es una serina proteasa y por lo tanto tiene una estructura que es diseñada para escindir proteínas (expresamente elastina). La elastasa tiene un sitio activo con tres aminoácidos principales: aspartato, histidina y serina que constituye la triada catalítica creando juntos una catálisis nucleofílica, aunque también los residuos voluminosos de valina ayudan en el cierre del bolsillo [166].

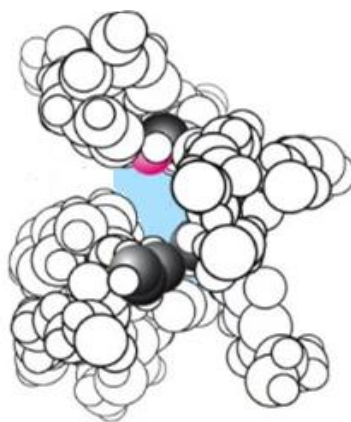


Figura 25. Sitio activo de la enzima elastasa [modificado 167].

La elastasa recibe este nombre porque hidroliza con rapidez la proteína elastina, la proteína que forma las fibras elásticas, uno de los componentes principales del tejido conectivo [166], puesto que las propiedades mecánicas de los tejidos se deben en primer lugar a su contenido de fibras de elastina que confiere elasticidad y en segundo al colágeno que aporta rigidez. El pulmón, las arterias y la piel son órganos elásticos, esta elasticidad se debe a que poseen una gran cantidad de haces de fibras elásticas capaces de deformarse y retornar a la longitud basal. El pulmón al tener muchas fibras elásticas y poco colágeno, funciona como un fuelle, inflándose y desinflándose con

el ritmo respiratorio, mientras que en la piel de las personas de edad y de los tomadores de sol se arruga porque pierde las fibras elásticas [168].

La estructura de la elastasa es bastante similar a otras enzimas serinas proteasas como la tripsina y quimiotripsina teniendo un 40% de la secuencia de aminoácidos idéntica y una estructura general muy similar [166]. La elastasa es rica en Ala, Gly y Val. El bolsillo de unión de la elastasa está en gran medida ocluido por las cadenas laterales de los residuos Val y Thr, que reemplazan los residuos Gly, que revisten los bolsillos de especificidad en quimiotripsina y tripsina [169].

El plasma humano contiene una pequeña proteína llamada alfa-antitripsina (AAT) que tiene la propiedad de inhibir la acción enzimática de varias proteasas importantes incluyendo la elastasa. La AAT es una de las proteínas “reactantes de fase aguda” cuya concentración plasmática se eleva en muchos estados inflamatorios, esta proteína restringe la destrucción de las fibras elásticas y paraliza que las infecciones pulmonares habituales resulten en fibrosis pulmonar y enfisema [168].

11.2. INHIBIDORES DE LA ENZIMA ELASTASA

Las alteraciones en el equilibrio entre la actividad de la elastasa de nucleófilos humana (HNE) y sus inhibidores reguladores se han relacionado con el desarrollo de una extensa cantidad de enfermedades que afectan al sistema pulmonar, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda, trastornos inflamatorios (psoriasis, dermatitis aterosclerosis y artritis reumatoide) por lo que se han descrito muchos inhibidores peptídicos y no peptídicos, aunque actualmente solo hay dos medicamentos disponibles para el uso clínico: Prolastin® (fármaco peptídico) y Silvelestat Elaspol® 100 (un inhibidor selectivo no peptídico de bajo peso molecular). Además del inhibidor AZD9668 (Alvelestat) que se encuentra en fase de ensayos clínicos [170].

12. ENZIMA LIPOXIGENASA

Las lipoxigenasas (LOX) son enzimas metaloproteínas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas con un hierro no hemínico Fe (II) en el sitio activo [159].

Los hidroperóxidos, son los productos resultantes de la reacción enzimática de lipoxigenasa con los ácidos grasos poliinsaturados [160] y peroxidan los ácidos grasos con los sistemas pentadienyl (1-cis,4-cis) como el ácido araquidónico, participando de esta forma en el proceso de

peroxidación lipídica. Son activadas por su producto de oxidación, es decir, cuando el Fe^{+2} (reductor) oxida a Fe^{+3} (oxidante), teniendo como sustrato natural el ácido araquidónico para las LOX de origen animal y el ácido linoleico para las LOX de origen vegetal, en el caso de las lipooxigenasas de las semillas de soja, están involucradas en procesos inmunológicos, de regulación del crecimiento y en la germinación [159], catalizando los primeros pasos de la ruta metabólica del ácido araquidónico que implica una serie de reacciones químicas cuyos productos están relacionados con la inflamación, por esta razón la enzima lipoxigenasa (como los ciclooxigenasas) son un blanco importante en el estudio de fármacos anti-inflamatorios [162].

Es por ello que estas enzimas son las responsables de catalizar una de las reacciones más importantes como es la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados ω -6, como el ácido linoleico y linolenico en las plantas y el ácido araquidónico en los animales (o la de sus correspondientes ésteres lipídicos), hasta un sistema hidroperóxido cis, trans-butadieno, para poder ser metabolizado por beta-oxidación [159]. Aunque las LOX también pueden actuar con algunos compuestos que tienen los dobles enlaces en su estructura química, como son los pigmentos naturales para el beta-caroteno y la clorofila [159].

Los antiinflamatorios a pesar de sus conocidos efectos secundarios, continúan siendo el grupo terapéutico más utilizado en el mundo en el tratamiento de procesos fisiopatológicos. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de enzimas que forman parte del metabolismo del ácido araquidónico [163].

El ácido araquidónico (AA), es el principal sustrato de las lipoxigenasas de mamífero, es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono y cuatro dobles enlaces en cis que presenta una gran flexibilidad conformacional, este ácido se obtiene de la dieta y se encuentra esterificado en los fosfolípidos de membrana y cuando por cualquier mecanismo las células son dañadas, es liberado al citoplasma por la acción de fosfolipasas celulares, como la A2. Una vez liberado puede seguir dos vías metabólicas (figura 26), la vía de la ciclooxigenasa, que determina la producción de prostaglandinas y tromboxanos o la vía delipoxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos e hidroperóxidos. Éstos tienen una función muy importante en las enfermedades inflamatorias y alérgicas, mediando el dolor, la fiebre y el edema [163].

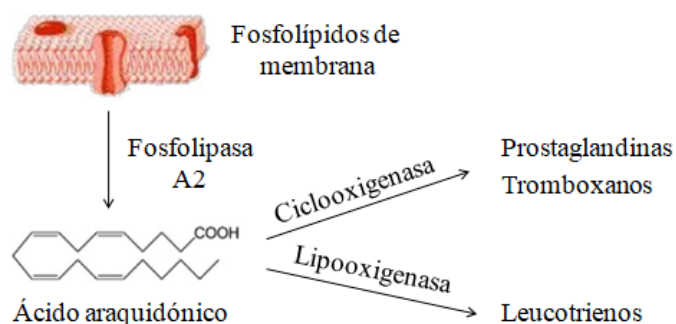


Figura 26. Vías metabólicas simplificadas del ácido araquidónico.

La actividad biológica de las lipoxigenasas de mamífero incluida la humana no es del todo conocida pero sin embargo si se ha descrito que las lipoxigenasas participan en distintas enfermedades como el asma, la aterosclerosis, el alzheimer, la artritis, la soriasis y algunos tipos de cáncer (colorrectal, prostático, de mamas, y pulmonar). Además las LOX están implicadas en la respuesta inflamatoria, dado que los productos de su reacción dan lugar a la formación de leucotrienos, lipoxinas, prostaglandinas y tromboxanos [161].

Todo esto hace que la búsqueda de inhibidores específicos para estas enzimas sea un foco interesante de investigación, demostrándose en diversos estudios que los flavonoides e isoflavonoides son buenos inhibidores para las lipoxigenasas [161].

12.1. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA LIPOXIGENASA: SITIO ACTIVO

La estructura de esta enzima es una sola cadena polipeptídica, con un dominio N-terminal que está orientado en el cuadrante superior izquierdo, presenta una estructura barril- β , formada por ambas capas de hojas anti-paralelas representadas en la figura 27 por las flechas amarillas.

El dominio catalítico C-terminal corresponde al resto de la estructura mayoritariamente representado por las hélices coloreadas en azul, el átomo de hierro catalítico en color naranja se sitúa en el centro de dicho dominio [164].

El hierro no-hémico presente en el sitio activo pasa del estado de oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+} en la catálisis de la reacción, cuando la enzima se encuentra activa. El metal se encuentra coordinado dentro del sitio activo por tres residuos de His, una Ile, una molécula de H_2O , y un residuo que varía entre His/Asn/Ser dependiendo del organismo en que se encuentre [161].

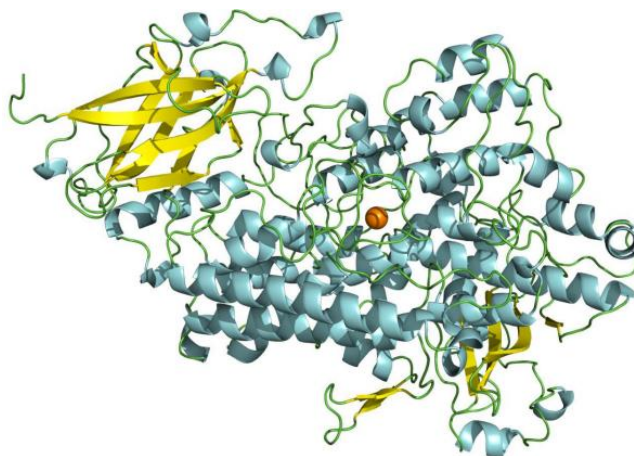


Figura 27. Estructura de la lipoxigenasa (LOX-1) de soja [164].

12.2. INHIBIDORES DE LA ENZIMA LIPOXIGENASA

Las propiedades antiinflamatorias del resveratrol, vienen definidas por su efecto antioxidante como inhibidor de las actividades enzimáticas de la COX y la LOX. El resveratrol es una fitoalexina presente en las uvas, mosto (sobre todo en el vino tinto). Estructuralmente el resveratrol es un polifenol con una estructura de dobles enlaces que existe en dos isoformas, *cis*- y *trans*-resveratrol, susceptible de ser oxidado, al igual que el ácido linoleico, por lipoxigenasa [165].

Otros inhibidores de la enzima lipoxigenasa, son el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y el 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA), caracterizados por ser buenas sondas del sitio activo de la LOX, por sus propiedades quelantes del Fe (III), también se han descrito varias clases de inhibidores de la LOX, como son los ácidos grasos acetilénicos, catecoles, ácidos hidroxámicos, fenoles, pirazolinas, fenilhidrazonas y disulfuros [159].

13. ANTIOXIDANTES

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que poseen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, condición que los torna altamente reactivos, por ello son capaces de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante [171].

En el ser humano se generan radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando reacciona el peróxido de hidrógeno con el Fe^{+2} ion ferroso, por la acción catalítica de la

ciclooxigenasa, en la reacción de la vitamina C con el ion ferroso, o por acción de la NADPH reductasa [171].

Por otro lado, los prooxidantes son especies altamente reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes [172, 173] y se localizan en los alimentos y en los sistemas biológicos. En los alimentos el proceso de auto-oxidación y generación de la rancidez es producido por radicales libres debido a la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, generando muchas enfermedades degenerativas [172, 174]. Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo origina el proceso denominado estrés oxidativo, asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas [172, 175] tales como cáncer, arterioesclerosis, artritis reumatoidea, algunas formas de anemia y diabetes, entre otras [172].

Los antioxidantes son conocidos como moléculas que actúan antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres; (etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos) [172, 178] retardando o previniendo la oxidación de otras moléculas, puesto que los radicales libres son susceptibles de reaccionar con compuestos oxidantes [175], estos se pueden clasificar en antioxidantes sintéticos o antioxidantes naturales [171].

En las últimas décadas ha aumentado de forma significativa el interés por los antioxidantes naturales ya que estos ofrecen mayor seguridad que los compuestos sintéticos, siendo por tanto más aceptados comercialmente, además los agentes fitoquímicos presentan más eficacia que sus correspondientes sintéticos [172, 179].

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y asimismo prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas [172, 180]. Por esta razón se pretende determinar el valor antioxidante de la colección de plantas de la Región de Doñana, dada la importancia de conocer nuevos agentes con propiedades antioxidantes y a la facilidad de acceso a recursos naturales propios.

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales [181].

13.1. DPPH: 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO

El método utilizado por el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas (DPPH), es uno de los más utilizados para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia [171]. La molécula de DPPH es conocida por ser un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, lo que hace que la molécula no se dimerice como sucede con la mayoría de los radicales libres, esto hace que el radical libre DPPH tenga la capacidad para aceptar un átomo de hidrógeno [172].

Este método desarrollado por Brand-Williams et al en 1995 [172], determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso [182], es decir, se basa en la estabilización del radical el cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado que da una coloración violeta [172].

Al entrar la disolución de DPPH en contacto con una sustancia antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R^*) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la correspondiente pérdida del color y por tanto pérdida de la absorbancia [183], siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm, determinándose por diferencia de absorbancias el porcentaje de captación de radical libre DPPH [184].

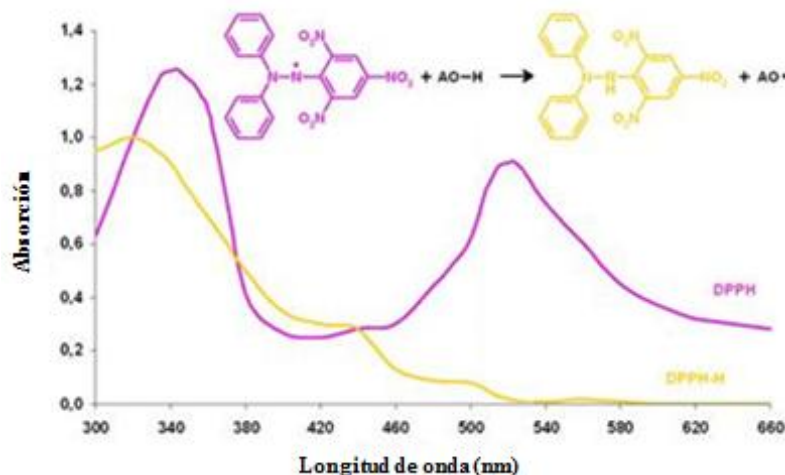


Figura 28. Gráfico de cambio de coloración del DPPH de violeta a amarillo cuando está expuesta a una sustancia oxidante [modificado 185].

En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales [181], además este método posee unos tiempos de

reacción de 20-30 minutos en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos necesario para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox [172, 186].

Generalmente los resultados de DPPH se han expresado como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definida como la cantidad de antioxidantes necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%, cuyo valor se obtiene de representar el porcentaje de inhibición frente a la concentración del extracto [172].

13.2. POLIFENOLES Y FAVONOIDES

Los polifenoles y flavonoides son constituyentes muy apreciados en las plantas, ya que poseen una gran cantidad de grupos hidroxilo en su estructura [172, 187] lo que favorece la captura y secuestro de radicales libres [181, 188], es por ellos que de la mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales es debida a estos compuestos [181]. Así mismo una gran cantidad de estudios han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas incluyendo los flavonoides son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos [181].

La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, al contener estos en su estructura química un número variable de grupos hidróxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres [181].

Por otro lado los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos dos de sus unidades fenólicas, estando ampliamente distribuidos en las plantas y entre ellos se pueden encontrar flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononoles, catequinas, flavononas [172, 189].

Para determinar el contenido de polifenoles de una planta o matriz vegetal, se recurre al método de reactivo Folin-Ciocalteu (F-C) que utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción. Este ensayo mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/ fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo, produciéndose una reacción de transferencia de electrones entre el Mo(VI) y el reductor, es decir, la mezcla de ácido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que es reducido, de la oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungstenio (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo la coloración azul producida proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en las muestras, teniendo una absorción máxima a 765 nm [172, 181, 190].

Dicho ensayo es comúnmente utilizado tanto por su simplicidad como por la disponibilidad comercial del reactivo al ser un procedimiento estandarizado puesto que los polifenoles son fácilmente oxidables en un medio básico por el reactivo F-C [172].

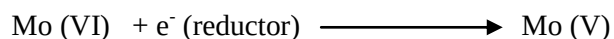


Figura 29. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu [172, 190].

En la actualidad hay un creciente interés enfocado en los flavonoides, puesto que se ha evidenciado su gran importancia en la dieta humana debido a la gran variedad de actividades biológicas que estos presentan; entre ellas inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa), efectos antibacteriales, actividad antiinflamatoria y antioxidante. Puesto que estos actúan como antioxidantes; ayudan a contrarrestar o disminuir el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares o el estrés oxidativo [172, 191, 192].



CHAPITRE I

INTRODUCTION

Ce premier chapitre de la thèse traitera du problème de la pollution de l'environnement, en soulignant le rôle des polluants dits émergents qui ont fait l'objet d'études ces dernières années par la communauté scientifique, en raison de l'impact majeur que leur présence provoque dans les écosystèmes environnementaux. Plus précisément, les drogues constituent un groupe abondant de composés, dont la présence dans l'environnement a augmenté beaucoup plus que tout autre polluant depuis les années 1970.

Nous nous concentrerons sur les problèmes posés par les médicaments couramment prescrits pour l'homme et pour le bétail, en nous concentrant sur six principes actifs, la carbamazépine, la fluméquine, la ciprofloxacine, l'enrofloxacin, le diclofénac et l'ibuprofène et leurs effets sur trois différentes espèces végétales qui composent la flore du Parc National de Doñana: *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia europaea*; l'étude des métabolites ou produits de dégradation de cette interaction sera également examinée.

Sa présence dans des zones protégées telles que le Parc National de Doñana, dans les environs duquel plusieurs principes pharmacologiques actifs ont déjà été identifiés dans des échantillons d'eau [1], est principalement attribuée à l'inefficacité des stations d'épuration des eaux usées (SEEU) pour éliminer ces composés dans le traitement des eaux usées. De plus, la présence de fermes d'élevage dans la région constitue un autre point d'entrée pour ce type de contaminants émergents, principalement en raison de leur utilisation pour le traitement des animaux. Les caractéristiques de l'environnement de Doñana, formé de terres inondables et de marais, favorisent la mobilité des polluants dans ses différentes zones.

De même, l'étude des métabolites ou des produits de dégradation des substances actives sélectionnées produites dans les matrices végétales sélectionnées sera abordée, à la fois d'un point de vue dirigé, ce qui rend nécessaire de savoir quels métabolites possibles nous pouvons trouver, et d'un point de vue non dirigé, de rechercher des composés possibles non décrits à ce jour, ainsi que les utilisations possibles que ces plantes peuvent avoir pour la décomposition de divers contaminants, ce qui leur permettrait d'être utilisés dans les processus de bioremédiation.

Enfin, un examen approfondi des différentes enzymes utilisées dans les tests enzymatiques sera effectué: tyrosinase, élastase, collagénase, lipoxigénase, leur structure, leur mode d'action et les inhibiteurs les plus fréquemment utilisés pour chacun d'eux. Le comportement de ces enzymes doit être connu afin de pouvoir reproduire leur mécanisme d'action au niveau du laboratoire pour trouver des molécules possibles dans les échantillons de plantes analysées ayant la capacité de les inhiber.

1. LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE ET SON DIAGNOSTIC

Les dommages que l'homme a causés à l'environnement en satisfaisant ses besoins vitaux ont donné lieu à divers problèmes de pollution, et donc à de graves problèmes de santé, puisque la présence dans l'environnement d'un ou plusieurs polluants ou d'une combinaison de ceux-ci, nuit à la vie, à la santé et au bien-être des personnes, à la flore, à la faune, à la dégradation de la qualité de l'air, des sols et des eaux, ce qui a entraîné la prise des mesures nécessaires à la résolution des problèmes générés pour l'environnement [2].

L'activité humaine a de graves conséquences sur la pollution des espaces naturels parmi d'autres écosystèmes, favorisant la pollution des eaux souterraines et de surface (rivières, lacs, réservoirs, aquifères, zones humides et mers) qui s'y trouvent, substances qui modifient leur composition, dégradent la qualité et entravent la fonction écologique de l'eau. Il est donc nécessaire de connaître les éléments et les facteurs qui contaminent ces milieux, ainsi que leur implication dans la détérioration de leur qualité [3, 4].

Une des principales sources de pollution dans les milieux naturels est l'eau usée, qui représente un danger car elle contient une grande quantité de substances et/ou de micro-organismes, étant source de pollution dans les lieux où elle est évacuée sans traitement préalable. Ils peuvent être classés en fonction de leurs origines dans les eaux domestiques ou les *eaux noires* qui présentent une grande quantité de matières organiques, de micro-organismes, de résidus de savon, de détergents et de graisses car ils proviennent des fèces et urines humaines, de l'hygiène personnelle, du ménage, etc. et des *eaux blanches*, qui peuvent être d'origine atmosphérique (pluie, neige et glace) ou du nettoyage des espaces publics comme les rues, parcs etc. Enfin, les *eaux usées non urbaines*, qu'elles proviennent des travaux agricoles et d'élevage en milieu rural ou de la transformation effectuée dans les usines et les établissements industriels, contiennent des huiles, détergents, antibiotiques, acides, graisses et autres produits d'origine minérale. Dans de nombreux cas, les eaux résiduelles sont utilisées sans traitement préalable ou après des traitements qui ne sont pas tout à fait adéquats pour l'irrigation des récoltes, ce qui, lorsqu'elles sont consommées sous forme brute, fait que des substances toxiques ou des micro-organismes sont incorporés directement à l'organisme [4, 5].

Parfois, ce ne sont pas les déchets qui causent la disparition des organismes de l'eau, mais pour la décomposition des polluants sont nécessaires de grandes quantités d'oxygène, qui peuvent être totalement consommées, créant ainsi des conditions anoxiques qui limitent la vie aquatique.

C'est pourquoi ces dernières années ont émergé une prise de conscience des niveaux de résistance et d'adaptation des êtres vivants aquatiques à certaines substances et éléments présents dans l'eau. Cela a conduit à l'utilisation de la flore et de la faune comme bioindicateurs de la qualité de l'eau, puisque leur abondance ou leur absence dans l'environnement indique le degré de pollution de cette dernière [5].

Parmi les principales sources de pollution, il convient de mentionner les:

-Agents pathogènes: Il s'agit de tous les types d'entités biologiques (bactéries, virus, parasites ou autres organismes) capables de produire des maladies chez l'homme, la flore et la faune, car ils proviennent de déchets organiques qui ont été déversés dans les rivières, lacs ou réservoirs sans avoir préalablement subi un processus de purification adéquat.

- Produits chimiques organiques: substances chimiques qui contiennent du carbone et qui ont été fabriquées par l'homme, comme le pétrole, l'essence, les pesticides ou les plastiques qui peuvent rester dans l'eau pendant plus de 50 ans.

-Déchets organiques: Ensemble des déchets organiques (huiles, graisses, protéines, etc.) produits par l'homme ou les animaux.

-Produits chimiques inorganiques: Ce groupe comprend les acides minéraux, les sels ou les métaux toxiques (mercure ou plomb) dont la présence en grande quantité dans l'eau cause des dommages aux systèmes aquatiques, réduisant ainsi la biodiversité.

-Éléments nutritifs inorganiques des plantes (azote et phosphore): L'augmentation des nitrates et des phosphates dans l'eau modifie les conditions de l'environnement en raison de l'eutrophisation, c'est-à-dire la croissance excessive des algues et autres organismes, modifiant leur état en consommant une plus grande quantité d'oxygène.

-Sédiments ou matières en suspension: Ce sont les particules insolubles du sol qui obscurcissent les eaux et rendent la vie difficile pour certains organismes, dont l'accumulation de sédiments détruit les frayères.

-Substances radioactives: Les isotopes radioactifs solubles peuvent être présents dans l'eau en raison de l'activité des centrales thermonucléaires et plus fréquemment, des traitements et diagnostics hospitaliers.

-Pollution thermique: Le rejet d'eau chaude par les centrales électriques ou les activités industrielles augmente la température des rivières ou des réservoirs, ce qui diminue la teneur en oxygène présente dans l'eau et affecte donc la vie des espèces aquatiques [5].

1.1. POLLUANTS ÉMERGENTS

Au cours des dernières décennies, le nombre de nouveaux polluants non réglementés, appelés polluants émergents, a augmenté. Ces composés présentent des effets importants puisqu'ils affectent la santé des êtres humains et des espèces animales même lorsqu'ils sont présents en faibles concentrations, perturbant le système endocrinien et bloquant ou perturbant les fonctions hormonales, entre autres effets toxiques [6].

Un polluant émergent est un matériau, un élément, un composé, une espèce chimique, voire un phénomène physique inconnu ou méconnu dont la présence dans l'environnement (aliments, produits naturels, artificiels) ou dans tout être vivant n'est pas récente, mais les conséquences de son existence peuvent être néfastes. Leur contrôle n'est pas réglementé par les administrations publiques et la disponibilité des méthodes et techniques pour leur analyse est très limitée [7].

Les rejets de polluants émergents sont considérés comme un problème grave pour l'environnement et la santé (tels que les produits d'hygiène personnelle, les détergents, les parfums, les surfactants ou les produits pharmaceutiques, entre autres) [8], non pas précisément parce que leur présence dans l'environnement est nouvelle, mais en raison de leur intérêt environnemental. Ces composés comprennent: les retardateurs de flamme bromés, les paraffines chlorées, les pesticides polaires, les composés perfluorés, les médicaments, les produits pharmaceutiques, les métabolites et/ou les produits de dégradation de toutes les substances mentionnées ci-dessus [9].

Les retardateurs de flamme bromés sont utilisés dans un grand nombre de produits commerciaux (meubles, plastiques, tissus, peintures, appareils électroniques, etc.), ce qui permet de produire environ 200.000 tonnes par an [9] et d'accorder une plus grande attention à ce type de composés car ils sont présents dans un grand nombre d'échantillons, tant environnementaux, humains qu'animaux. [9, 10]. Tout cela, ajouté à leur forte persistance dans l'environnement, à leur biodisponibilité élevée et aux effets nocifs possibles (qui n'ont pas été entièrement démontrés) comme la neurotoxicité, les perturbations endocriniennes et le cancer, a accru l'intérêt, les préoccupations et les études sur ces substances [9].

Les paraffines chlorées sont des formulations industrielles qui consistent en des mélanges techniques d'alcanes polychlorés à chaîne linéaire avec des chaînes hydrocarbonées ayant entre 10 et 30 atomes de carbone et entre 30 et 70% de chlore, cataloguées cancérogènes par l'Agency for Cancer Research avec un degré de chloruration de 60%. Ces mélanges commerciaux sont classés en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans les paraffines chlorées à longue chaîne (18-30 carbones), à chaîne moyenne (14-17 carbones) et à chaîne courte (10-13 carbones), qui sont les plus toxiques et utilisées. Sa production mondiale s'élève à 200 formulations commerciales et

plus de 300.000 tonnes par an. En raison de leur faible volatilité, de leur solubilité dans l'eau et de leur caractère lipophile, ils ont une forte tendance à s'adsorber dans les sédiments où les concentrations les plus élevées sont observées, bien qu'ils aient aussi tendance à s'accumuler dans les oiseaux et les poissons mammifères. Tout cela, ajouté à son utilisation excessive et à une lente dégradation chimique et biologique, a justifié les nombreuses études de ces dernières années [9].

Les **pesticides**, en particulier les plus apolaires, sont étudiés depuis des décennies, c'est pourquoi on connaît très bien leur présence et leur devenir dans l'environnement [9].

Récemment, toutefois, les préoccupations au sujet des produits de dégradation de ces composés ont augmenté, car ils sont, dans de nombreux cas, plus toxiques que les composés de départ [9].

Les **détergents perfluorés** sont un exemple de composés à usage industriel qui sont utilisés depuis des années dans un grand nombre de secteurs et sont maintenant considérés comme des polluants très dangereux et largement répandus dans l'environnement. C'est le cas du sulfonate de perfluorooctane, qui est utilisé comme réfrigérant ou détergent. Ces composés ont été détectés dans le sang et le foie humain, dans le foie et les graisses animales, ainsi que dans les eaux de surface et souterraines [9, 11].

La présence de **drogues** faisant l'objet d'un abus et les effets possibles de ces drogues et de leurs principaux métabolites sur l'environnement ont retenu aussi l'attention ces dernières années [9].

De tous les contaminants émergents, **les médicaments**, et en particulier les antibiotiques, sont ceux qui suscitent actuellement le plus de préoccupations quant à l'augmentation de leur utilisation au cours des dernières décennies, car ce sont des molécules dont l'activité biologique et les propriétés physico-chimiques très diverses contribuent à leur persistance dans l'environnement, conditionnent leur distribution et favorisent leur bioaccumulation. Ces composés sont généralement présents en faibles concentrations et la plupart d'entre eux restent non réglementés ou non réglementés, d'un point de vue environnemental, par de nombreux pays [9].

Les principes actifs pharmacologiques sont des substances chimiquement définies capables de modifier l'activité cellulaire d'un organisme vivant et donc de produire un effet biologique, bénéfique ou toxique en fonction de la dose fournie [12, 13]. Étant des substances, dans la plupart des cas, solubles dans l'eau, elles sont capables d'être présentes à tous les stades du cycle de l'eau, de sorte qu'il n'y a pas d'élimination complète malgré les différents procédés appliqués dans les stations d'épuration, d'où la nécessité de connaître l'effet toxicologique sur les organismes et donc ses conséquences pour les personnes [14].

Dans les années 1970, les premières preuves de la présence de drogues dans le milieu aquatique ont été trouvées aux États-Unis, où l'acide clofibrique, métabolite actif de plusieurs régulateurs des lipides sanguins (clofibrate et éthofibrate), a été trouvé dans les eaux usées; cependant, ce n'est que vers le début des années 1990 que la présence massive des drogues dans l'eau a été signalée [9].

En raison de leurs effets physiologiques, la flore peut devenir plus sensible à leurs impacts, même si la concentration des médicaments est faible, et leur combinaison peut avoir des effets importants en raison de mécanismes d'action de type synergique [12, 15].

Parmi les médicaments les plus couramment prescrits en médecine humaine figurent l'ibuprofène et le diclofénac, qui appartiennent aux groupes des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les antiépileptiques comme la carbamazépine, les antibiotiques comme l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole, puis les bêta-bloquants tels le métoprolol. Ce sont donc les groupes pharmacologiques les plus étudiés et ils sont de plus en plus utilisés en médecine vétérinaire et dans des activités telles que l'aquaculture, l'élevage ou l'aviculture [9].

Les médicaments vétérinaires sont destinés à traiter les maladies et à protéger la santé animale. Leur rejet dans l'environnement se produit directement, comme dans les exploitations agricoles, indirectement par l'épandage de fumier animal (contenant des produits excrétés dans le sol) ou par les excréments animaux directement dans les pâturages [16, 17].

L'impact des médicaments vétérinaires sur l'environnement dépend des quantités utilisées, des pratiques d'élevage, du mode d'administration, de la toxicité environnementale, des propriétés physico-chimiques, du type de sol, du climat, des pratiques de gestion du stockage du fumier et du taux de dégradation du fumier [16].

Selon les caractéristiques du sol et les propriétés physico-chimiques des médicaments, de leurs métabolites et des produits de dégradation, ils peuvent atteindre les eaux souterraines (contaminant les aquifères) [12, 18] ou être retenus dans le sol et s'accumuler, affectant l'écosystème et les organismes vivants par la chaîne alimentaire [9].

Les concentrations auxquelles les produits pharmaceutiques ont été trouvés dans les eaux de surface, en raison d'une élimination incomplète dans les stations de traitement des eaux, ou dans les eaux souterraines en raison de la faible atténuation subie par certains composés pendant la filtration dans le sol, varient dans la plage du ng/L au µg/L, tandis que dans les sols et les sédiments, elles peuvent atteindre le g/kg car elles persistent pendant de longues périodes, comme dans le cas de l'acide clofibrique dont on a estimé à 21 ans [9, 19, 20] sa demi-vie. Mais ce qui préoccupe davantage la communauté scientifique, c'est la présence de certains médicaments comme

l'ibuprofène, le diclofénac ou la carbamazépine dans l'eau potable [9]. La figure 1 résume les différentes voies d'entrée des drogues dans l'environnement par les eaux.

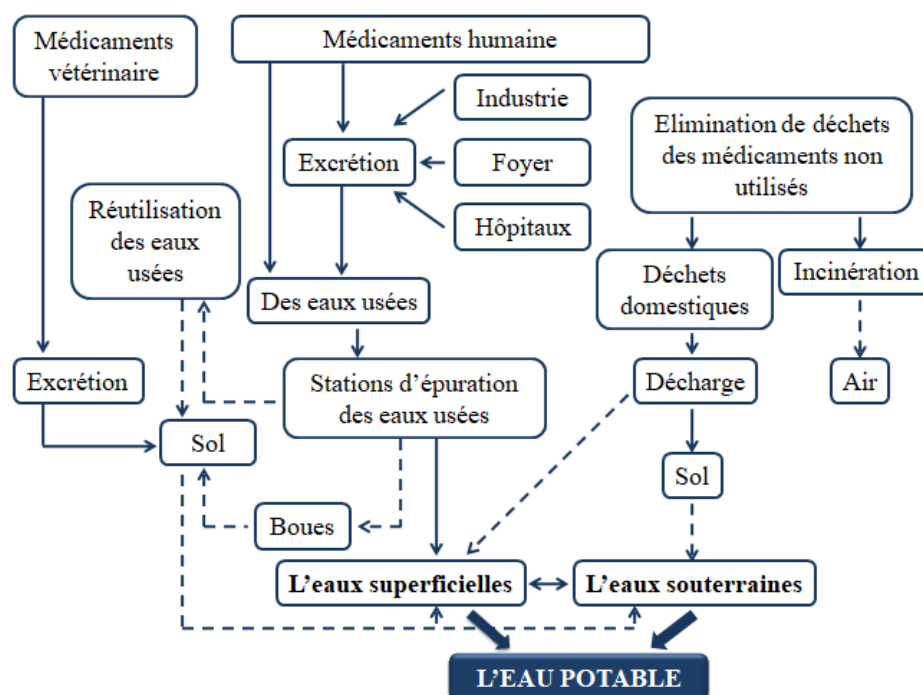


Figure 1. Voies simplifiées d'entrée de produits pharmaceutiques à l'environnement [12].

1.2. LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

La pharmacocinétique étudie l'évolution temporelle des concentrations du médicament dans l'organisme, c'est-à-dire la façon dont l'organisme traite le médicament administré, en élaborant des modèles pour évaluer ou prévoir l'action thérapeutique ou toxique d'un médicament [21].

On distingue quatre grands processus pharmacocinétiques : absorption, distribution, métabolisme et excrétion.

1.-Absorption : Comprend l'entrée du médicament dans l'organisme par l'extérieur dans l'environnement interne, c'est-à-dire dans la circulation systémique. A travers les membranes biologiques par des procédés de diffusion passive (filtration à travers les pores ou diffusion passive directe), de transport spécialisé (diffusion facilitée ou transport actif), endocytose, exocytose, utilisation d'ionophores et utilisation de liposomes. Il dépend des caractéristiques physico-chimiques du médicament, dans les cas où le médicament est administré par une voie différente de

la voie intraveineuse, un phénomène connu sous le nom d'élimination persistémique se produit, de sorte qu'il y a une dégradation partielle du médicament avant sa distribution dans le corps, rendant ainsi son absorption incomplète, de même avant distribution, le médicament peut être absorbé par le tube digestif et être métabolisé dans la foie, qui est connu comme le premier stade hépatique [22, 23].

2.- Distribution : A ce stade, le médicament est transporté du lieu d'absorption au lieu d'action, ce qui lui permet d'atteindre les organes dans lesquels il doit agir ou dans lesquels il doit être métabolisé, en effectuant le transport par la circulation systématique et en se produisant de différentes manières, comme la dissolution dans le plasma, fixation aux protéines plasmatiques ou liaison aux cellules sanguines, car pour accéder à l'intérieur des cellules et des structures cellulaires, les médicaments doivent passer à travers les membranes organiques, c'est pourquoi les médicaments les plus liposolubles pénètrent plus facilement et sont distribués plus rapidement que les médicaments hydrosolubles qui sont habituellement éliminés sans modification [22, 23].

3.- Métabolisme : Il s'agit du processus de biotransformation de médicaments qui, en raison d'une série de réactions chimiques et biochimiques, produisent d'autres composés qui peuvent être éliminés plus facilement appelés métabolites [23].

Ces réactions sont causées par l'activité de certaines enzymes présentes principalement dans la foie, bien qu'elles soient également présentes dans les reins, les poumons et l'intestin de telle sorte qu'un composé peut être modifié en plusieurs sites simultanément ou transformé par des réactions successives, entraînant un grand nombre de métabolites qui peuvent être classés selon leur activité biologique en quatre groupes : Les métabolites moins actifs (souffrant d'activité biologique) dont le composé initial est appelé prodrug, les métabolites actifs mais avec une activité thérapeutique différente de celle du médicament de départ et enfin les métabolites actifs sous un angle toxique [23].

De cette façon, le composé pharmaceutique une fois excrété peut atteindre l'environnement inchangé, sans subir aucun changement, sous la forme de ses produits de dégradation, comme métabolite principal ou comme mélange de plusieurs métabolites par diverses réactions biochimiques d'oxydation, réductions, hydrolyse, conjugaison, etc. Les médicaments liposolubles peuvent être transformés en substances plus ionisables, et donc plus solubles dans l'eau. Pour cette raison, le métabolisme est un processus fondamental qui conditionne l'activité pharmacologique du médicament et son élimination [22, 23].

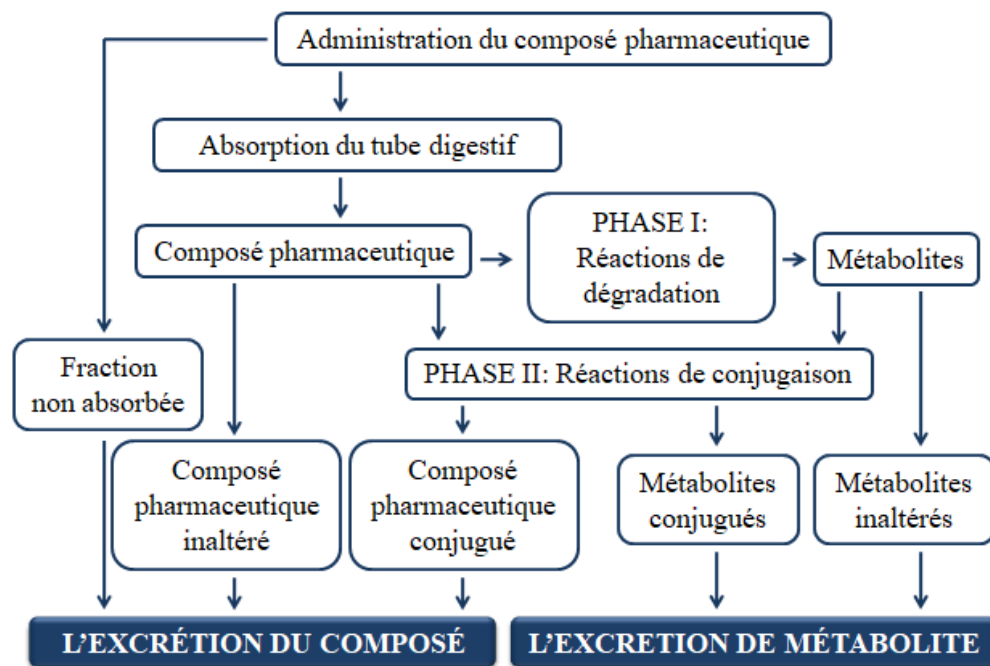


Figure 2. Réactions de transformation de composés pharmacologiques dans l'organisme [12].

Les réactions responsables du métabolisme sont classées en réactions de phase I et réactions de phase II.

Les réactions de phase I, réactions de dégradation : oxydoréduction et hydrolyse [12], dans lesquelles des groupes fonctionnels incorporés dans la molécule, tels que des groupes hydroxyle, des groupes amino ou des groupes acide carboxylique augmentant leur polarité, résultant de ces réactions peuvent être l'inactivation de la même avec excrétion ultérieure, ou sa transformation en une réaction plus active, sensible à de nouvelles réactions de phase II [23, 24].

Les réactions de phase II sont principalement des réactions de conjugaison avec l'acide glucuronique [12]. Leur but est d'augmenter la taille de la molécule en la couplant à un substrat endogène, provoquant son inactivation, qui, dans la plupart des cas, se produit sur les molécules du médicament ou sur les produits des réactions de phase I [23, 24].

Les transférases sont des enzymes présentes principalement dans le foie et catalysent ces réactions de conjugaison dont les produits sont caractérisés par une polarité généralement plus élevée et sont plus solubles dans l'eau que le composé de départ, ce qui les rend plus facilement excrétés [23]. Selon le substrat avec lequel la réaction a lieu, on distingue plusieurs types de conjugaison, dont la glucuronidation, qui consiste en la conjugaison de l'acide glucuronique avec des alcools, phénols, acides carboxyliques, amines aromatiques et thiols.

Elle est considérée comme l'une des voies métaboliques les plus importantes dans le cas des médicaments dont les produits sont appelés glucuronides [23].

Les oxydations, très variées, sont le moyen de transformation le plus fréquent, produisant la perte d'une partie de la molécule ou l'incorporation d'oxygène, deux types d'oxydations peuvent être différenciés, les oxydations microsomiques qui sont les plus courantes dans le métabolisme des médicaments et les oxydations non microsomiques, celles-ci sont moins fréquentes et sont catalysées par différentes enzymes, parmi lesquelles il existe le cytochrome P450 et la flavinmonooxigénase (FMO) située essentiellement dans le microsome hépatique [23].

Tout ce processus métabolique a lieu chez l'homme, si nous nous concentrons sur les animaux, nous constatons que la pharmacocinétique varie selon les espèces de sorte que les animaux carnivores et omnivores monogastriques, présentent un processus d'absorption similaire à celui qui se produit chez l'homme dans l'intestin grêle, produisant une métabolisation dans le foie [23, 25].

4.- Excrétion: C'est l'étape par laquelle les médicaments atteignent l'environnement, la façon dont ils atteignent dépend des conditions idiosyncrasiques de chaque individu pour métaboliser l'ingrédient actif, qui dépend de l'âge, le sexe et la santé [12, 23].

1.3. LE PROBLÈME DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT

Les substances pharmacologiquement actives appartiennent à une famille de composés formés par des molécules relativement variées et chimiquement complexes, ayant des poids moléculaires, des structures et des fonctionnalités différentes. De plus, il s'agit généralement de molécules polaires ayant plus d'un groupe ionisable, avec une persistance dans l'environnement de plus d'un an pour les médicaments tels que l'érythromycine, le cyclophosphamide, le naproxène, le sulfaméthoxazole, etc. et de plusieurs années pour l'acide clophyrique, ce qui leur confère une activité biologique très élevée [26].

Ainsi, par exemple, seulement 2 à 3% de la dose administrée de carbamazépine est excrétée sous sa forme originale. Dans le cas du diclofénac, 1% est excrété comme tel et 60% sous forme de glucuronides. Dans le cas du bézafibrate, qui est un antilipidémiant, 50% de la dose administrée est excrétée sous forme de glucuronides et 20% sous sa forme originale [26, 27].

D'autre part, et bien qu'à court terme, il semble qu'aucun effet grave sur la santé ou l'environnement ne puisse être détecté, les effets potentiellement cumulatifs des médicaments à

moyen et long terme sont probables, puisqu'ils peuvent causer des changements dans l'environnement et/ou des dommages aux humains, comme la prolifération de micro-organismes résistant aux antibiotiques, et la combinaison des différents métabolites et composés biologiquement actifs formant un cocktail pharmacologique peut pouvoir renforcer les effets négatifs [26].

Les stations d'épuration des eaux usées (SEEU) n'éliminent pas complètement les produits pharmaceutiques des eaux usées, et il est également prouvé que bon nombre de ces substances sont peu ou pas biodégradables dans l'environnement [28, 26]. Les composés hydrophiles résistants à la dégradation peuvent demeurer dissous dans la phase aqueuse ou adsorber dans les boues [26].

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les premières preuves de la présence de drogues dans l'environnement font référence à la détection de l'acide clophyrique dans les eaux usées américaines dans les années 1970. En Espagne, la présence d'autres drogues a été confirmée, comme dans les analyses effectuées dans l'Ebre en 2005, où l'ibuprofène ($60 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), l'acétaminophène ($42 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), le gemfibrozil ($46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), l'aténolol ($72 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) et la carbamazépine ($30 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) [29] ont également été détectés en Allemagne en concentrations pouvant atteindre $1075 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [30], dans les eaux superficielles dans les années 90. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont constaté que la carbamazépine n'est pas complètement éliminée des eaux usées lors du passage dans les systèmes de traitement de l'eau [31].

Parmi les quatre médicaments les plus couramment utilisés: le paracétamol, l'acide acétylsalicylique, l'ibuprofène et le diclofénac, seul le diclofénac a un faible taux d'élimination alors que les trois premiers sont facilement dégradables dans les stations d'épuration, en fait seulement 4% du paracétamol est éliminé dans sa forme originale alors que l'amoxicilline l'est à 60%. Le bézafibrate (10-97%) et l'ibuprofène (12-86%) sont partiellement éliminés dans les stations d'épuration, les rendements dépendant clairement de l'âge des boues, mais dans le cas du diclofénac, la réduction est indépendante de l'âge des boues [26, 32, 33].

Dans le groupe des antibiotiques, les pénicillines s'hydrolysent facilement dans l'eau tandis que les tétracyclines précipitent facilement avec des cations comme le calcium qui s'accumulent dans les boues [26, 34].

La plupart de ces substances, qui ne sont pas entièrement dégradées dans les stations d'épuration des eaux usées, sont rejetées avec les effluents et se retrouvent dans les eaux de surface et souterraines avec des analgésiques, des antilépémiques et des anticonvulsivants, il a été démontré que pour tous ces médicaments à l'exception des antiépileptiques, les stations d'épuration fonctionnant avec des systèmes à boues activées présentaient dans leurs effluents des

concentrations inférieures d'analgésiques et d'antipémiqes que les stations sans épuration des boues [26].

Dans le cas du diclofénac, diverses études confirment qu'il produit des effets néfastes pour une grande variété d'espèces fauniques. Ces effets négatifs se concentrent sur le système rénal de la plupart de ces espèces animales, étant particulièrement néfastes pour les oiseaux [16, 35].

De nombreuses études scientifiques ont démontré que l'utilisation du diclofénac chez les bovins a causé une insuffisance rénale chez les charognards qui ont ingéré les carcasses médicamentees, entraînant la mort de ces individus [36]. On a observé que plusieurs aigles des steppes (*Aquila nipalensis*) trouvés morts dans une décharge de l'État du Rajasthan (Inde) avaient des résidus de diclofénac dans leurs tissus et présentaient les mêmes signes cliniques d'insuffisance rénale que les vautours du genre *Gyps* intoxiqués par ce médicament [16]. La diminution de la population de vautours a été principalement causée par le diclofénac [16, 37], utilisé pour traiter le bétail domestique contre différentes pathologies, de sorte que les vautours ont été exposés au médicament lorsqu'ils ont consommé les cadavres des animaux qui avaient été traités avec ce médicament peu avant leur mort. Ces oiseaux sont morts d'insuffisance rénale peu de temps après l'exposition, c'est-à-dire après ingestion des tissus contaminés par le diclofénac. De même, le diclofénac a été décrit comme affectant les tissus des branchies et des reins des poissons d'eau douce, ce qui suggère également un risque possible pour ces espèces [16].

1.4. CARACTÉRISTIQUES DES SUBSTANCES ACTIVES ÉTUDIÉES

1.4.1 ANTI-INFLAMMATOIRES NON STÉROÏDIENS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont chimiquement un groupe de médicaments hétérogènes [38], généralement des acides faibles qui sont séquestrés dans les cellules présentes dans les milieux acides, comme l'estomac, les reins ou les articulations enflammées; ce processus est appelé piégeage ionique [38, 39].

Le principal mécanisme d'action de ces médicaments est l'inhibition de la production de prostanoïdes en bloquant l'enzyme COX, inhibant ainsi la formation de prostaglandines (PG) et de thromboxanes (TX) dans la voie métabolique de l'acide arachidonique. Les PG régulent les situations pathologiques, telles que les processus inflammatoires, la douleur et la fièvre tandis que les TX font partie de la famille des eicosanoïdes, un groupe de substances lipidiques qui possèdent un large éventail d'actions biologiques [38].

En 1991, il a été mis en évidence qu'il n'y avait pas qu'une seule enzyme COX, mais au moins deux types: les COX-1 et COX-2 qui présentent la même affinité pour l'acide arachidonique et une capacité similaire à le convertir en PGH_2 (forme précurseur des autres PG) [38].

Les deux enzymes ont une homologie de 60% en termes de composition en acides aminés [40], ont la même masse moléculaire et ont des sites actifs similaires pour leur substrat naturel et pour le blocage par les AINS, certains ont tendance à inhiber principalement la COX-1, d'autres développeront une préférence pour la COX-2, certains seront des inhibiteurs exclusifs de la COX-2 et d'autres encore bloqueront les deux isoenzymes de manière équivalente, puisque tous les AINS partagent un même mode d'action mais pas tous ont la même affinité pour l'enzyme [38, 40].

Ainsi, les AINS en interagissant avec les COX, bloquent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines, entraînant le passage du métabolisme de l'acide arachidonique à une autre voie: celle de la lipoxgénase, entraînant une augmentation de la production d'autres médiateurs chimiques, appartenant également à la famille des eicosanoïdes, comme les leukotriènes (LTs) [38].

L'inhibition réversible compétitive avec l'acide arachidonique est le mécanisme par lequel la plupart des AINS agissent, bien que le mécanisme d'interférence COX ne soit pas commun à tous les AINS, l'inhibition irréversible réalisée exclusivement par l'acide acétylsalicylique et l'inhibition réversible non compétitive réalisée par le paracétamol devraient être notées [40].

L'enzyme COX-1 a été cataloguée comme enzyme constitutive, c'est-à-dire présente dans la plupart des tissus sanguins et des plaquettes, développant un grand rôle physiologique car elle est impliquée dans les fonctions de régulation de l'activité cellulaire, comme la coordination de l'action des hormones circulantes et l'homéostasie vasculaire, tandis que la COX-2 est une enzyme de type inductible, qui est absente ou à de très faibles concentrations dans les cellules normales, mais qui est rapidement induite par les médiateurs inflammatoires, le facteur de nécrose tumorale, les facteurs de croissance ou les endotoxines bactériennes qui sont libérées au site de l'inflammation [37, 39].

La figure suivante montre schématiquement la libération et la synthèse d'eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique, étant HPETE l'acide hydroxy-peroxy-eicosatétraénoïque et PGG_2 la prostaglandine G_2 [38].

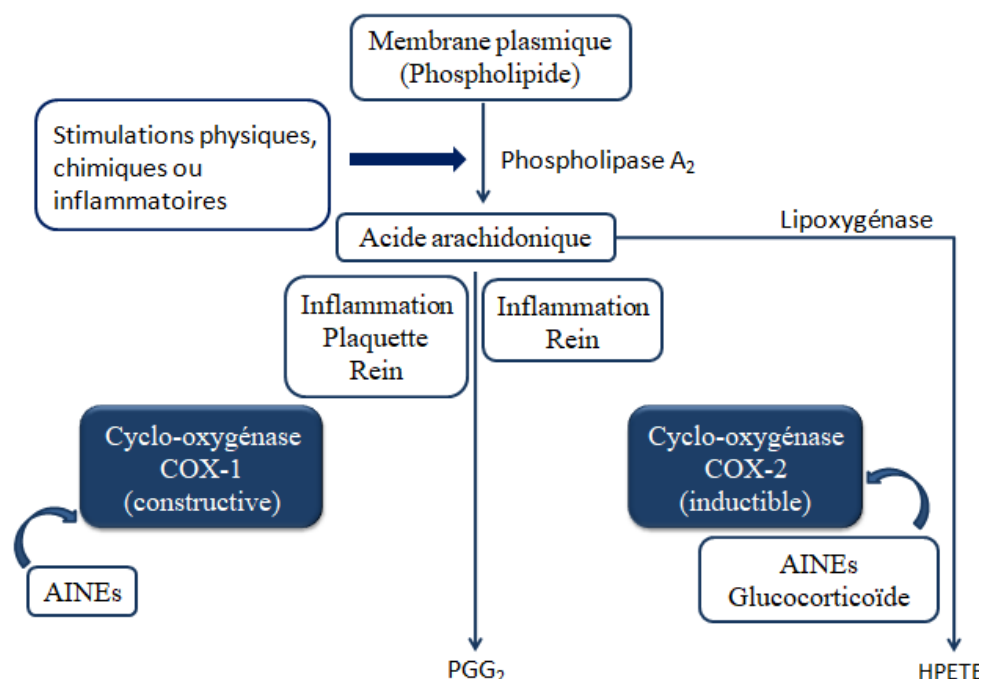


Figure 3. Synthèse d'eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique [38].

L'inhibition de la COX-2 justifierait une activité anti-inflammatoire, tandis que l'inhibition de la COX-1 expliquerait les effets indésirables en supprimant la synthèse des eicosanoïdes nécessaires aux fonctions physiologiques de l'organisme. Par conséquent, l'activité plus ou moins grande contre chacune de ces isoenzymes serait déterminante dans l'incidence des effets indésirables qui apparaissent après l'administration de différents AINS aux doses thérapeutiques [40].

Comme la plupart des AINS sont des acides organiques faibles, leur élimination rénale varie en fonction du pH de l'urine. Le piégeage ionique des molécules ionisées (peu liposolubles) dans l'urine alcaline facilite l'excrétion chez les herbivores, le contraire étant observé chez les carnivores et les omnivores, chez ces derniers l'urine est généralement acide, l'ionisation est donc supprimée, la molécule est plus liposoluble et donc facilement réabsorbable [40]. C'est pourquoi seules de petites fractions de la dose administrée de la plupart des AINS sont éliminées sans changement dans l'urine, quelle que soit l'espèce, en supposant que la plupart des AINS sont initialement biotransformés au niveau hépatique en métabolites actifs ou inactifs. Comme l'acide acétylsalicylique et la phénylbutazone qui sont convertis respectivement en salicylate et oxifenbutazone, les métabolites sont beaucoup plus actifs que le médicament initial [40].

1.4.1.1. DICLOFÉNAC

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien de la famille de l'acide arylacétique, dont la principale mission pharmacologique est de réduire la fièvre, la douleur et l'inflammation en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique [16, 41].

La biotransformation du diclofénac se fait par glucuronidation de la molécule intacte, puisqu'environ 60 % de la dose administrée de diclofénac est excrétée avec l'urine sous forme de conjugué glucuronide de la molécule intacte, de sorte que seulement 1 % est excrété comme substance non modifiée. Le reste de la dose est éliminé sous forme de métabolites principalement par hydroxylation et méthylation, dont la plupart sont également convertis en glucuronides conjugués (3'-hydroxy-, 4'-hydroxy-, 5-hydroxy-, 5-hydroxy-, 4'5-dihydroxy- et 3'-hydroxy-4'-méthoxy diclofénac) par la bile des selles et par leur activité biologique mais à un degré beaucoup moindre que le diclofénac [42].

Parmi les effets secondaires et les réactions indésirables, les troubles digestifs, les troubles du système nerveux central, des sens, de la peau et des reins sont les plus importants chez les animaux sensibles, entraînant une insuffisance rénale aiguë qui est habituellement réversible après le retrait du médicament [16, 41].

La présence de diclofénac dans les eaux usées constitue un problème en raison de son faible taux d'élimination dans les procédés de traitement des eaux usées, ce qui fait du diclofénac un des principes actifs les plus fréquents dans les effluents des eaux de surface, avec des concentrations variant de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ à $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [9].

1.4.1.2. IBUPROFÈNE

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien dérivé de l'acide propanoïque aux propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques marquées.

Il est largement métabolisé dans le foie par hydroxylation et carboxylation du groupe isobutyle dépourvu de ses métabolites d'activité pharmacologique, dont l'élimination (principalement rénale) est considérée totale après 24 heures. Environ 10 % sont éliminés sans modification, tandis que 90 % sont éliminés sous forme de métabolites inactifs, principalement sous forme de glucuronides [42]. De plus, 60 % de la dose est éliminée dans les 24 premières heures, tandis que dans les 5 jours suivant la prise d'ibuprofène, 80 à 100 % de la quantité du médicament est éliminée [23, 43].

Parmi les processus de biotransformation que ce médicament peut subir dans l'organisme figurent l'inversion énantiomérique et le métabolisme oxydatif [23]. L'inversion énantiomérique est nécessaire pour la transformation de la forme inactive de l'ibuprofène R (-) en l'énantiomère S (+) pharmacologiquement actif [23, 44]. Alors que le métabolisme oxydatif, produit plusieurs métabolites qui seront éliminés dans différentes concentrations et par différentes voies. Ainsi, environ 66 % du médicament est excrété par les reins, tandis que 34 % l'est par les voies biliaires [23].

On obtient quatre métabolites, dont trois sont des produits de l'hydroxylation aliphatique de l'ibuprofène (1-hydroxyibuprofène, 2-hydroxyibuprofène et 3-hydroxyibuprofène) et le carboxibuprofène étant le produit de l'oxydation du 3-hydroxyibuprofène en acide carboxylique [23, 44].

Puisque la molécule d'ibuprofène a un caractère chiral, ses métabolites auront également des centres chiraux, ce qui entraînera l'apparition d'énantiomères et de stéréoisomères, comme les deux énantiomères du 2-hydroxyibuprofène et les quatre stéréoisomères du carboxyibuprofène [23, 44].

1.4.2. ANTIÉPILEPTIQUES

1.4.2.1. CARBAMAZÉPINE

La carbamazépine est un anticonvulsivant utilisé dans le traitement des convulsions tonico-cloniques et des crises complexes ou simples (avec ou sans perte de conscience), bien que son efficacité ait également été démontrée dans le traitement de certains troubles psychiatriques, tels que la manie dépressive et le comportement agressif produit dans la démence sénile, ainsi que dans le traitement de la douleur d'origine neurologique. Il contient également des anticholinergiques, des antirythmiques, des relaxants musculaires, des sédatifs et des bloqueurs neuromusculaires [45, 46, 47].

Le mécanisme d'action de la carbamazépine n'est pas bien connu, on croit qu'elle stabilise les membranes nerveuses hyperexcitées, inhibe les décharges pneumorales et réduit ainsi la propagation synaptique des impulsions excitatrices. Empêcher ainsi les décharges répétitives des potentiels d'action dépendants du sodium dans les neurones dépolarisés par l'utilisation et le blocage des canaux de tension dépendants du sodium [45, 47].

D'autre part, la réduction du glutamate et la stabilisation des membranes neuronales peuvent être responsables des effets antiépileptiques, tandis que les effets antipsychotiques sont dus à une production réduite de dopamine et de noradrénaline [45].

Après une administration orale de carbamazépine, 28 % de la substance est excrétée dans les selles et 72 % dans l'urine, dont environ 2 % ne subissent pas de modifications et atteignent l'environnement par les eaux usées et environ 1 % est éliminé sous forme de 10, 11-époxydecarbamazépine, métabolite pharmacologiquement actif [45], avec d'autres métabolites importants étant le dérivé 10,11-transdiol et son glucuronide, la faible efficacité d'élimination dans les stations d'épuration des eaux usées [31], ainsi que le métabolite 10,11-dihydroxy-10-hydroxy-carbamazépine, trouvé avec le métabolite 10,11-époxyde-carbamazépine en concentrations élevées dans les eaux de surface [48].

1.4.3. FLUOROQUINOLONES

Les quinolones sont une famille d'antibiotiques d'une grande importance dans la prise en charge de nombreuses maladies communautaires et nosocomiales [49].

L'origine des quinolones était l'acide nalidixique (quinolone de première génération) [49] découvert par Leshner en 1962, qui présentait une activité antimicrobienne efficace contre les bactéries Gram-négatives et atteignait des concentrations thérapeutiques impertinente dans l'urine et n'était utilisé que pour traiter les infections urinaires. Les composés qui lui ont succédé (acide oxolinique, acide pipémidique, cinoxacine) dans les années 70 avaient peu d'avantages supplémentaires par rapport à la molécule originale, mais plus tard en 1985 sont apparus des fluoroquinolones avec des propriétés pharmacocinétiques très avantageuses et une toxicité très réduite qui font qu'elles sont toujours très présentes dans la recherche scientifique pour obtenir de nouveaux médicaments antibactériens. D'un point de vue microbiologique, ils étaient à l'origine actifs contre les germes aérobies Gram-négatifs, mais plus tard ils ont élargi leur spectre vers les aérobies Gram-positifs et les bactéries atypiques. Aujourd'hui, les nouvelles fluoroquinolones actuellement utilisées uniquement en médecine humaine sont également actives contre les germes anaérobies [50].

Les fluoroquinolones apparaissent avec l'incorporation d'un atome de fluor dans la molécule. La substitution d'un atome de fluor en position 6 améliore la liaison à son enzyme cible, l'ADN-gyrase bactérienne, et améliore la pénétration cellulaire jusqu'à 70 fois par rapport aux quinolones, l'incorporation du fluor était un saut qualitatif dans le développement de ces composés, puisque non seulement l'efficacité contre les pathogènes Gram-négatifs a été augmentée, mais aussi le spectre d'activité a été élargi aux pathogènes Gram-positifs [51], étant par ailleurs très bien absorbés par voie orale, ce qui permet d'atteindre des concentrations tissulaires importantes et ayant une demi-vie relativement longue, ils peuvent être administrés à des intervalles allant de 12 à 24 heures [50].

Les quinolones sont des agents bactéricides totalement synthétiques dont le mécanisme d'action est d'inhiber la synthèse de l'ADN bactérien, d'entrer dans la cellule par les porines (canaux d'eau de la membrane), et d'interférer avec l'action de l'ADN-gyrase, une enzyme bactérienne impliquée dans les processus biologiques qui compromettent l'ADN, comme la transcription, la recombinaison, la réplication et la réparation de la même (topoisomérase II), en inhibant cette forme enzymatique des complexes enzymatiques avec elle, cela se produit pour les germes Gram négatif. Pour les germes à Gram positif, l'action se situe principalement au niveau des complexes de topoisomérase de type IV [49, 51].

Dans le cas des fluoroquinolones, leur mécanisme d'action est le même que celui des quinolones, mais ils ont une excellente activité contre une grande variété d'agents pathogènes vétérinaires Gram négatif et ont démontré une activité significative contre les agents pathogènes intracellulaires [51].

Par la suite, des quinolones de deuxième et de troisième génération telles que la ciprofloxacine et l'enrofloxacin ont émergé respectivement et ont une grande utilité thérapeutique grâce à une série de modifications structurales qui déterminent leurs caractéristiques pharmacologiques permettant leur utilisation orale pour traiter efficacement diverses infections systémiques, qui ne pouvaient auparavant être traitées que par antibiotiques, ce qui leur confère un spectre extraordinaire [49, 51, 52, 53].

Les plus utilisés en médecine vétérinaire sont l'amifloxacine, la ciprofloxacine, l'enrofloxacin, la marbofloxacine ou la norfloxacine [51].

1.4.3.1. CIPROFLOXACINE

La ciprofloxacine est un agent antimicrobien de la classe des fluoroquinolones, actif contre un large spectre de germes aérobies à Gram négatif et contre les germes à Gram positif [51, 54].

Les effets antibactériens de la ciprofloxacine sont dus à l'inhibition de la topoisomérase IV et de l'ADN-gyrase bactérienne qui a deux sous-unités. Ces topoisomérases modifient l'ADN en introduisant des plis super hélicoïdaux dans l'ADN double brin, ce qui facilite le déroulement des brins. Les quinolones inhibent ces sous-unités en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien, bien qu'on ne sache pas exactement pourquoi l'inhibition de l'ADN-gyrase entraîne la mort bactérienne [54].

La ciprofloxacine est largement distribuée dans tout l'organisme, avec une liaison minimale aux protéines plasmatiques, mais atteint des concentrations élevées dans la bile, les poumons, les

reins, le foie, la vessie, l'utérus, les tissus de la prostate, l'endomètre, les trompes et les ovaires. Chez les patients présentant une fonction rénale, l'élimination normale de la demi-vie est de 3 à 5 heures, mais peut augmenter jusqu'à 12 heures chez les sujets présentant une insuffisance rénale [54].

1.4.3.2. ENROFLOXACINE

L'enrofloxacin est une fluorquinolone développée exclusivement pour la médecine vétérinaire, qui est considérée non toxique chez la plupart des animaux, bien qu'elle ait des effets toxiques chez certaines espèces animales [51].

Il présente un indice thérapeutique élevé et peut être administré efficacement et en toute sécurité en association avec d'autres médicaments, ce qui le rend largement utilisé dans différentes espèces domestiques, exotiques et sauvages [55]. Par exemple, chez les bovins, les ovins et les chevaux, l'enrofloxacin est largement et rapidement distribuée dans tout l'organisme ; il en va de même chez les veaux, où l'on a observé de fortes concentrations après 12 heures d'administration dans la bile, l'urine, le foie, les reins, le cœur, les poumons et la rate. Chez le porc, l'élimination se fait lentement mais avec des niveaux élevés dans la muqueuse nasale, les poumons, le foie, les muscles, le tissu lymphatique et la paroi intestinale. De même, une augmentation de la fréquence et de l'intensité des crises a été observée chez des chiens épileptiques sous traitement lorsqu'ils reçoivent de l'enrofloxacin [56, 57].

L'enrofloxacin est métabolisée en ciprofloxacin [53] (principalement dans le foie) qui est responsable d'une partie considérable de l'activité antimicrobienne y compris contre les microorganismes résistants ou non sensibles aux antimicrobiens couramment utilisés chez les animaux [55].

1.4.3.3. FLUMÉQUINE

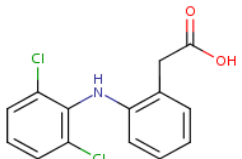
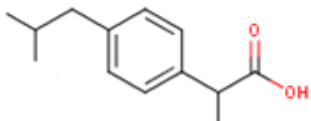
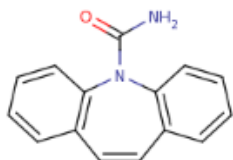
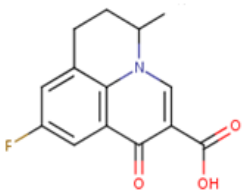
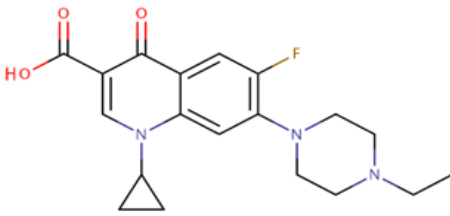
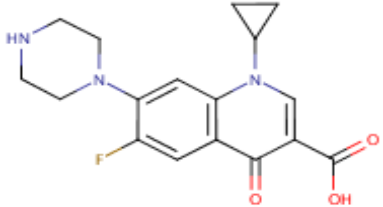
La fluméquine est une quinolone monofluorée de première génération dont le spectre d'action bactéricide se concentre principalement sur les bactéries Gram négatif. Son mécanisme d'action, comme le reste des quinolones, se produit par l'inhibition de l'ADN-girase bactérienne (topoisomérase II), empêchant la rotation axiale négative de la molécule d'ADN et la topoisomérase IV, bloquant le processus de réplication, transcription et recombinaison de l'ADN bactérien [58, 59].

Après administration orale, il atteint sa concentration plasmatique maximale en moins de 2 heures, localisée dans le sang de fluméquine non modifié et son métabolite hydroxylé, avec moins d'activité : entre 40 et 60 % de la dose absorbée sous forme de médicament non modifié est excrétée dans l'urine tandis que le reste est éliminé sous forme d'un métabolite glucoconjugué inactif, et une petite portion est éliminée dans les fèces [59].

Après son absorption orale dans le poisson est observée une distribution rapide et large dans tout le corps, effectuant le métabolisme dans le foie et l'excrétion principalement sous forme de fluméquine non modifiée dans les branchies comme c'est le cas du saumon (60 %), les voies urinaires et le canal biliaire qui ont des concentrations plus élevées dans les branchies et le foie et dans une moindre mesure dans les os et la peau et enfin dans les muscles [58].

Le tableau suivant énumère les principes actifs des études, leurs structures compositionnelles élémentaires, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et les acronymes utilisés pour les nommer dans cette thèse.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des composés pharmaceutiques sélectionnés.

Composé	Abréviation	Structure	Classe thérapeutique	Log P	pKa	logKow	Composition élémentaire
Diclofénac	DCL		Anti-inflammatoire non stéroïdien	4.02	4.15	4.51	$C_{14}H_{13}Cl_2NO_2$
Ibuprofène	IBU		Anti-inflammatoire non stéroïdien	3.72	4.41	3.97	$C_{13}H_{18}O_2$
Carbamazépine	CBZ		Agent antiépileptique	2.67	13.9	2.45	$C_{15}H_{12}N_2O$
Fluméquine	FMQ		Antibiotique	2.41	5.70	2.60	$C_{14}H_{12}FNO_3$
Enrofloxacin	ENR		Antibiotique	1.88	6.43	0.70	$C_{19}H_{22}FN_3O_4$
Ciprofloxacin	CPR		Antibiotique	0.65	6.43	0.28	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$

2. MÉTABOLISME DES VÉGÉTAUX

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques effectuées par les cellules d'êtres vivants pour synthétiser des substances complexes à partir de substances plus simples ou pour obtenir des substances plus simples par dégradation de substances complexes. La majeure partie du carbone, de l'azote et de l'énergie se retrouve dans des molécules communes à toutes les cellules, présentes dans tous les êtres vivants, comme les acides aminés, les nucléotides, les sucres et les lipides qui remplissent les mêmes fonctions dans toutes les plantes, ceux-ci font partie du métabolisme primaire [60].

Les organismes végétaux produisent une grande diversité de composés chimiques, dont une partie est synthétisée dans les voies du métabolisme primaire, à partir desquels sont produits les composants qui participent au processus photosynthétique ou au métabolisme respiratoire. Le reste, qui ne sont pas directement indispensables à ces processus, provient des voies métaboliques secondaires [61], qui leur permettent de produire et d'accumuler différents composés chimiques, puisque les plantes utilisent une partie du carbone et de l'énergie assimilés pour la synthèse de différentes molécules organiques qui n'ont pas une fonction évidente dans les processus de photosynthèse, respiration, assimilation d'aliments, transport des solutés ou synthèse des protéines, glucides ou lipides et qui sont appelés métabolites secondaires car ils viennent du métabolisme secondaire des plantes [60].

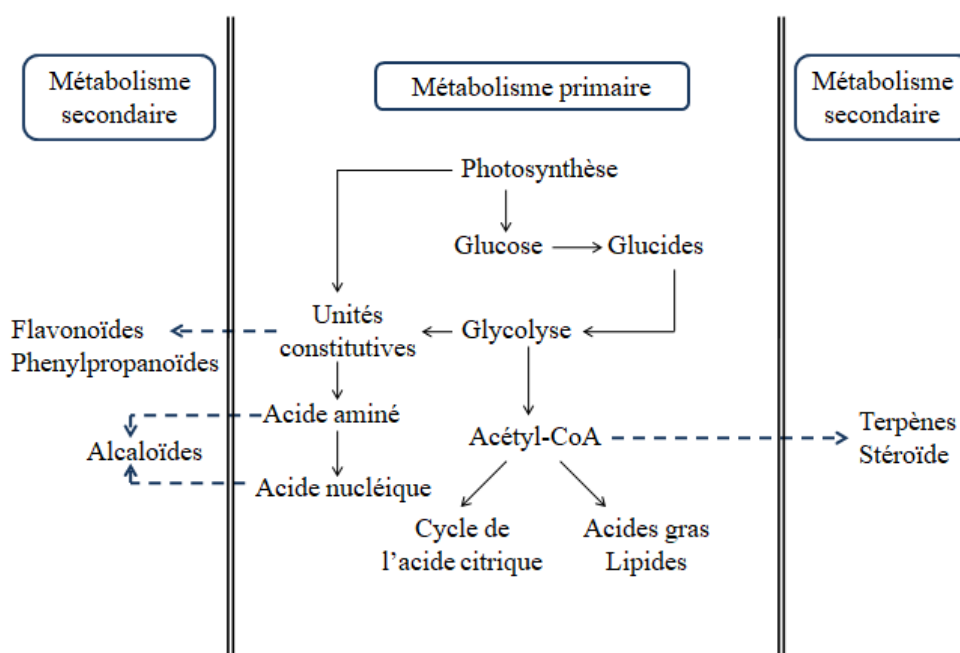


Figure 4. Éléments du métabolisme des plantes [60].

Ces métabolites secondaires, outre le fait qu'ils n'ont pas de fonction spécifique dans les processus susmentionnés, diffèrent des métabolites primaires en ce qu'ils ont une distribution restreinte dans le règne végétal, c'est-à-dire que tous les métabolites secondaires ne se retrouvent pas dans tous les groupes de plantes, puisque la quantité et la synthèse des métabolites secondaires et les relations entre différents composants dépendent tant du sexe et de la famille auxquels la plante appartient, que des facteurs internes et externes l'entourant, à savoir les relations avec le milieu [60].

La capacité à synthétiser des composés secondaires a été choisie au cours de l'évolution en fonction des besoins de chaque plante: dans la nature, les plantes sont exposées à des facteurs biotiques et abiotiques avec lesquels elles ont co-évolué et la pression exercée par ceux-ci tout au long du processus évolutif détermine le développement dans les plantes des voies de biosynthèse par lesquelles elles synthétisent et accumulent dans leurs organes une grande variété de métabolites secondaires [61], qui ont un rôle transcendantal dans les interactions de la plante avec l'environnement qui l'entoure, comme par exemple, les arômes floraux et les pigments sont utilisés pour attirer les pollinisateurs, principalement des insectes [61, 62].

Les plantes stressées accumulent souvent ces métabolites en réponse à des éliciteurs ou à des signaux moléculaires provenant de l'action de micro-organismes pathogènes ou d'un environnement défavorable, que la plante identifie par des récepteurs dans la cellule végétale [61].

On estime que le génome de la plante contient entre 20.000 et 60.000 gènes et que 15 à 25 % de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme secondaire. Le génome d'une espèce végétale spécifique ne déchiffre qu'une partie non pertinente de toutes les enzymes qui seraient nécessaires pour synthétiser l'ensemble complet des métabolites secondaires présents dans le règne végétal [61].

Les plantes aromatiques et médicinales sont liées à tout ce qui se développe en étant caractérisées par la production, dérivée du métabolisme secondaire, d'une série de composants appelés ingrédients actifs, avec des applications en médecine, dans l'industrie aromatique et dans l'alimentation [61]. Dans les plantes aromatiques, ses principes sont formés, totalement ou partiellement, par les huiles essentielles qui donnent à la plante, à son extrait ou aux produits avec lesquels elle est mélangée, un arôme agréable à sentir [61, 63].

Plusieurs études scientifiques menées au cours des dernières années démontrent la capacité des plantes à accumuler les contaminants émergents dans le sol et les tissus comestibles. De nombreuses études ont montré, par exemple, que la présence de pesticides est métabolisée par les plantes en phases I, II et III [64].

Les enzymes ayant une capacité métabolique élevée capables de détoxifier les composés xénobiotiques sont le monooxygène du cytochrome P450, la glycosyltransférase et la glutathion S-transférase [65].

Ceux-ci sont distribués dans les trois phases principales du métabolisme des plantes, la phase I, a lieu dans le réticulum endoplasmique de la cellule végétale, la transformation des composés xénobiotiques en composés plus solubles par la monooxygénase du cytochrome P450, par des processus de transformation comme l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse, étant plus réactive que le composé original par incorporation des groupes fonctionnels tels que $-OH_2$, $-NH_2$ ou $-SH$ [64, 66, 67].

Puis dans la phase II qui se produit dans la conjugaison de l'appareil de Golgi avec les glycosides par l'enzyme glycosyltransférase ou un glutathion via la glutathion S-transférase, ou des aminoacides pour diminuer la toxicité, c'est-à-dire, les composés activés ont également été conjugués avec des molécules endogènes, comme les glucides, l'acide malonique ou le sulfate, la conjugaison des acides aminés est générée comme une réaction latérale plutôt que comme une étape majeure de désintoxication [64, 66].

Enfin, en phase III, la compartimentation des xénobiotiques et des métabolites dans la vacuole (stockage dans la vacuole de la plante) se produit avec sa réaction suivante par liaison à la paroi cellulaire [64, 66].

La figure 5 [68] montre la décomposition d'une cellule végétale et ses trois phases du métabolisme des composés xénobiotiques.

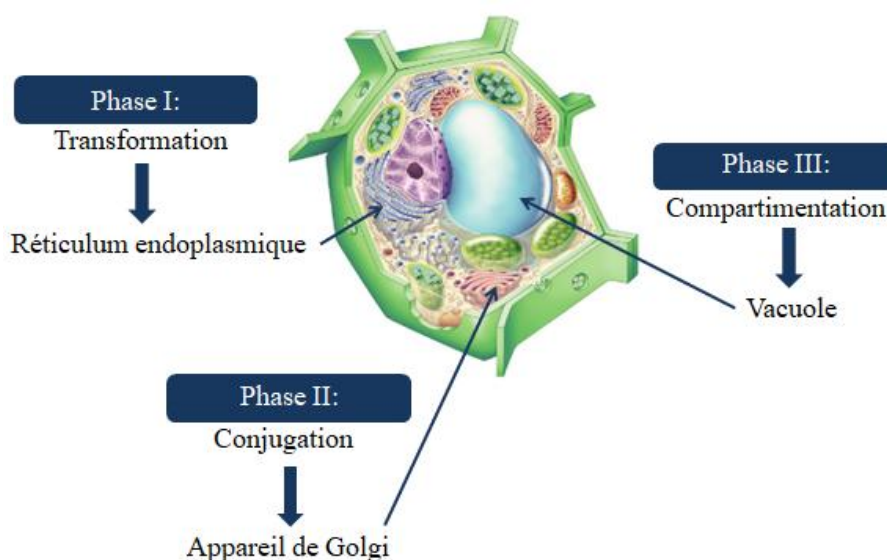


Figure 5. Cellule végétale.

Par exemple, dans le cas du diclofénac, il subit un métabolisme rapide, dans lequel les principaux métabolites des phases I et II sont les formes hydroxylées 4-OH-diclofénac et 5-OH-diclofénac et les formes conjuguées 4-O-glucopyranosyloxyclofénac et 4-OH-glutation et diclofénac [69, 70] et selon les auteurs Huber et al., la formation du réactif diclofénac-2,5-iminoquinone a été observée, due à l'activité des peroxydases végétales [69, 71].

Chez les mammifères, il y a d'abord une hydroxylation de l'un des noyaux phényle catalysée par les cytochromes P450 monooxygénases, les deux métabolites les plus courants étant le 3' et le 4'OH-diclofénac et une forme double hydroxylée en position 4' et 5', suivi par une glucuronidation du groupe acide carboxylique de la molécule, formant en très faibles quantités les conjugués sulfate et glutathion, mais connus uniquement chez les mammifères [70].

3. PROCÉDÉS DE BIORESTAURATION

Dans les années 1980, le terme biorestauration est apparu, se référant à la possibilité d'appliquer des stratégies d'assainissement de l'environnement avec une base biologique [72], en utilisant la capacité des micro-organismes à effectuer des processus de dégradation, nettoyer le sol et l'eau polluée, c'est-à-dire utiliser des éléments biologiques qui favorisent l'oxydation, dégradation, transformation et minéralisation complète de différents polluants. Ces méthodes de traitement biologique sont soumises à la capacité des organismes à dégrader ou à réduire les polluants organiques présents dans l'environnement [73].

Les méthodes de traitement biologique dépendent de la capacité des micro-organismes à dégrader les déchets en produits inoffensifs (dioxyde de carbone, eau et biomasse) par des réactions biochimiques ou jusqu'à certaines concentrations qui ne produisent pas d'effets nocifs sur l'environnement ou la santé humaine. Ces procédés ont acquis une grande importance ces dernières années, car ils sont peu coûteux et "respectueux de l'environnement" par rapport aux procédés physiques et chimiques traditionnels [73, 74, 75].

Ces processus de biorémédiation peuvent s'étaler sur plusieurs années, car pour les mener à bien dans leur intégralité, en récupérant et en restaurant les zones contaminées, plusieurs facteurs sont en jeu, tels que la quantité de polluants, les conditions environnementales qui favorisent la prolifération et l'activité des organismes utilisés, ainsi que la composition des sols, la disponibilité des nutriments et le degré de contamination [73].

Parmi les différentes techniques de biorestauration, il convient de souligner la **biostimulation**, qui est le processus par lequel la flore microbienne autochtone est stimulée par l'ajout d'oxygène, d'eau et de nutriments minéraux afin de faciliter la dégradation des polluants [75, 76] ou la **phytoremédiation**, où les plantes sont utilisées pour réparer les sols contaminés par des composés organiques, puisque ceux-ci éliminent et sont capables de détruire les polluants ou quoi qu'il en soit, pour restaurer les sols contaminés afin qu'ils retrouvent leur état naturel original et soient utilisés pour la culture. Plusieurs études ont confirmé la capacité des plantes et plus particulièrement de la zone rhizosphérique (zone de la racine de la plante en contact avec le sol) à réduire divers polluants tels que les insecticides et herbicides présents dans le sol [75].

Comme toutes les plantes n'effectuent pas les mêmes procédures biochimiques pour dégrader les différents contaminants, la phytoremédiation peut être classée en fonction de l'activité physiologique des plantes lorsqu'elles sont confrontées aux contaminants, ayant ainsi des plantes capables d'éliminer les contaminants inorganiques et ensuite de les accumuler dans leurs tissus, (phytoextraction / phytoaccumulation / phytominage) et les plantes qui participent à la réduction des polluants des eaux souterraines, de sorte que les plantes sont utilisées comme "système de pompage" des eaux contaminées par le processus de transpiration (phyto-pompage) [73].

D'autre part, il existe des plantes capables de libérer des enzymes spécifiques ou des cofacteurs enzymatiques qui provoquent la transformation ou la dégradation d'un contaminant organique par des processus de phytotransformation ou de phytodégradation [73].

Les enzymes expulsées par la plante dans la rhizosphère des usines de phytoremédiation ont beaucoup de travail dans la dégradation des composés organiques, par exemple la déshalogénase, la nitroréductase, la lacase et la nitrilase sont capables de détruire les polluants d'origine organique [75].

Différentes plantes ont été utilisées dans la phytoremédiation du diclofénac, comme c'est le cas du peuplier, qui a une activité enzymatique élevée, l'enzyme S-transférase a augmenté significativement dans les racines du peuplier après avoir été soumis à une exposition au diclofénac, avec une activité accrue de la peroxydaseascorbate et de la glutathion réductase lors de l'exposition à court et moyen terme au diclofénac, ceci démontre la capacité du peuplier à éliminer le diclofénac dans l'eau [69].

D'autres auteurs ont exposé la sensibilité du diclofénac à la photodégradation, mais en particulier Poirier-Larabie et al. [77] ont observé une photolyse rapide du diclofénac, de sorte

que seulement 14 % de sa concentration initiale est demeuré dans l'eau en 24 heures après exposition au soleil artificiel [69, 77].

À cet égard, d'autres études scientifiques ont montré que le blé est capable de stimuler l'enzyme toluène-o-monooxygénase par son expression à travers la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et des composés dégradants comme le trichloréthylène. Utilisé à la fois pour le blé et les plantes, la canne à sucre, le trèfle, le riz, le maïs, les pois, les graminées, le coton, la luzerne, le tabac, le lin et le soja dans la phytoremédiation des sols contaminés par des composés organiques comme le pétrole et ses dérivés [75].

Par exemple, des études menées par He Y. et al. ont révélé que les métabolites de l'ibuprofène présents dans *P. australis*, étaient semblables aux métabolites trouvés chez les mammifères et les microbes, mais dans les autres travaux scientifiques sur le métabolisme de l'ibuprofène effectués sur la plante aquatique *Lemna gibba L.*, un type de lentille aquatique, a détecté l'hydroxy-IBU et le 1,2-dihydroxy-IBU comme intermédiaires, mais pas l'IBU-Carboxy-IBU, de sorte que la voie métabolique suivie par l'ibuprofène dans les lentilles aquatiques était différente de celle des mammifères et des microbes, mais semblable au métabolisme fongique [65].

En général, ces études ont démontré que la phytodégradation de l'IBU se produisait effectivement dans les tissus de *P. australis* en transformant l'IBU en quatre produits intermédiaires [65].

De même, on sait que l'existence d'intermédiaires hydroxy-ibuprofène est liée à une plus grande activité du cytochrome P450, de sorte que la transformation de l'IBU en leurs métabolites respectifs est catalysée par P450 dans le réticulum endoplasmique, passant ensuite par la catalyse dans l'appareil Golgi, suivies d'un métabolisme supplémentaire ou d'un stockage dans des vacuoles ou des parois cellulaires, identifiant quatre intermédiaires possibles de l'IBU formée dans les matrices végétales, tels que l'hydroxy-IBU, le 1,2-dihydroxy-IBU, le carboxy-IBU et le glucopyranosyloxy-hydroxy-IBU (glucoside IBU- conjugué) [65].

La présence de diclofénac dans l'eau fait que des traces de ce principe actif atteignent différents organismes aquatiques, affectant, par exemple, l'intégrité de la membrane cellulaire de la lentille d'eau [69, 78] ou l'augmentation du stress oxydatif spécifique des tissus des moules [69, 79] de sorte que l'accumulation du diclofénac et de ses métabolites a été documentée chez les poissons, ainsi qu'une augmentation de l'activité des systèmes antioxydants enzymatiques dans les travaux menés par Islas-Flores et Guiloski [69].

Dans le cas du DCL, des recherches menées sur le métabolisme du DCL dans la plante *Typha latifolia* ont été trouvées dans la bibliographie consultée, démontrant l'existence du diclofénac sans métabolisation et les métabolites hydroxy-diclofénac, glucopyranosiloxy-hydroxy-diclofénac et conjugatodiclofénaco-glutation dans les racines et diclofenac et hydroxy-diclofenac dans les feuilles [65, 80].

Dans le cas du CBZ, comme mentionné ci-dessus, il persiste depuis longtemps à la fois dans les stations d'épuration des eaux usées et dans l'environnement, par exemple, plusieurs études ont révélé la présence de carbamazépine dans des essais effectués sur des tomates, ces légumes contenant des quantités de carbamazépine supérieures à 80 % de la quantité totale administrée, la plupart étant stockées dans les feuilles du plant, ainsi que des études scientifiques réalisées par Shenker [66, 81] ont démontré une absorption de carbamazépine par les concombres dans les cultures hydroponiques et les expériences en serre [66].

L'absorption de CBZ par la racine (patate douce et carotte) et les légumes (tomate et concombre) a été étudiée et deux produits de transformation de CBZ ont été déterminés: 10,11-dihydro- 10,11-dihydroxy-carbamazépine (DiOH-CBZ) et carbamazépine 10,11-époxyde (EP-CBZ) [66, 82]. La concentration de EP-CBZ était plus élevée dans les feuilles de patate douce et de carotte que dans le composé original, car le CBZ est connu pour persister longtemps dans les sols, il s'ensuit que ce composé est absorbé par les plantes [66], dans ce dernier cas il y a évidence d'absorption et de translocation du CBZ dans les cultures irriguées avec des eaux usées traitées [66, 82].

4. BIO-INDICATEURS DE CONTAMINATION

Les bio-indicateurs sont des organismes, ou communautés d'organismes, dont la présence indique le niveau de conservation ou l'état d'un habitat [83, 84]. Ils doivent être largement répartis, abondants, sédentaires, disponibles toute l'année et tolérer des variations environnementales, y compris des niveaux variables de pollution. Ils doivent également être facilement échantillonnés, identifiés, stockés et conservés pour avoir une bonne capacité nette de bioaccumulation [83, 85, 86].

Le bioindicateur idéal est un bioindicateur dont les tolérances environnementales sont étroites [83, 87], c'est-à-dire qui est sensible aux variations des facteurs physiques et chimiques de l'environnement dans lequel il vit, mesurant les effets de la pollution sur l'environnement et les êtres vivants eux-mêmes. C'est pourquoi elles fournissent beaucoup d'informations sur les

risques pour les organismes, l'écosystème et les êtres humains [83, 88] et peuvent être utilisées en raison de leurs caractéristiques telles que la sensibilité aux polluants, la dispersion, le succès de reproduction et la distribution, comme estimateurs des conditions environnementales qui sont difficiles et coûteuses à mesurer [83, 89].

L'utilisation des bio-indicateurs repose sur l'hypothèse que leur présence ou leur abondance est corrélée à une ou plusieurs variables de l'écosystème favorables à leur survie, constituant un lien entre le bio-indicateur et les variables à indiquer [83, 90]. Ils sont largement utilisés dans les études visant à évaluer les effets de l'activité humaine sur le biote, en définissant d'une manière générale la reconnaissance et la détermination des changements environnementaux, naturels ou induits par l'homme sur le biote. Elle est ainsi associée à un contrôle qualitatif, c'est-à-dire la présence ou l'absence d'un certain organisme, ou la capacité d'accumulation corporelle de l'élément [86].

Dans cette thèse, nous utiliserons comme bio-indicateurs trois variétés de plantes présentes dans le Parc National de Doñana, avec différentes demandes en eau pour leur cycle de vie, ce qui nous permet trois scénarios différents d'essais d'exposition. La *Lavandula dentata* a été sélectionnée parce que c'est une plante que l'on trouve dans presque tous les habitats, une plante ligneuse qui a peu besoin d'eau, la *Salicornia europaea*, qui pousse près des plages et la *Juncus sp.* qui vit dans les zones inondées.

4.1. LAVANDULA DENTATA

La lavande est une plante appartenant à la famille des *Lamiaceae* et est composée de 39 espèces de plantes subarborescentes, vivaces et ligneuses telles que *Lavandula dentata*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula lanata* ou *Lavandula spica*, dans une large gamme d'altitudes, selon les espèces, aux propriétés antiseptiques, antispasmodiques et toniques. Ses fleurs sont généralement utilisées pour l'élaboration de parfums et de colonies, bien qu'elles soient également utilisées à des fins ornementales et pour obtenir des essences [91, 92].

Dans le cas de la *Lavandula dentata* (figure 6), elle mesure entre 60 et 80 cm de haut. Les feuilles sont lancéolées avec un bord denté, leurs fleurs sont bilabées, d'une couleur oboïde bleu-violet intense, groupées en longues oreilles avec leur odeur caractéristique particulière, avec des feuilles vert grisâtre, fleurissant au printemps [91, 93]. Cette espèce de lavande s'étend de la région macaronésienne du Cap-Vert, sur les deux rives de la mer Rouge, dans tout le

bassin méditerranéen occidental, du nord-ouest de l'Afrique à la péninsule arabique, de l'Ethiopie aux deux rives de la mer Rouge [91].



Figure 6. *Lavandula dentata*.

Elle pousse sur des substrats caillouteux, de préférence calcaires, bien qu'il se dissémine parfois dans des sols argileux ou schisteux et pauvre en humus. Comme ce n'est pas une plante exigeante en termes de quantité de nutriments, elle peut pousser dans des milieux secs, donc elle peut très bien résister à la sécheresse méditerranéenne [91, 93].

4.2. *JUNCUS SP.*

Cette plante appartient à la famille des juncaceae, ce sont des plantes herbacées vivaces, en général elles sont rhizomateuses, c'est-à-dire qu'elles possèdent des rhizomes, des tiges souterraines dépourvues de feuilles, étant en très peu d'occasions à tuberculobulbes de développement rare ou à tubercules intercalés dans les racines, glabras. Elle possède généralement quelques tiges d'ascendance bien que chez certaines espèces il soit possible de trouver des tiges cylindriques ou comprimées, striées ou submergées. Les feuilles sont différenciées en gousses et lames, beaucoup d'espèces ont des lames cylindriques creuses ou à moelle spongieuse, il est aussi fréquent de trouver une lame plate, semi-cylindrique ou cannelée selon les espèces, alors que les gousses peuvent être ouvertes ou fermées [101].

Le genre comprend environ 316 espèces communément appelées roseaux, telles que *Juncus sp.* (figure 7) [102], *Juncus effusus*, *Juncus littoralis*, *Juncus capillaceus*, *Juncus tenuis*, etc. On les trouve principalement dans les zones tempérées et froides des deux hémisphères, et rarement sous les tropiques [101].

Ce sont des plantes aquatiques émergentes, comme les roseaux, les énéras, etc, c'est-à-dire des plantes amphibies qui vivent en eaux peu profondes, enracinées dans le sol dont les tiges et les feuilles émergent de l'eau, atteignant jusqu'à 2 ou 3 mètres de hauteur, ces plantes intermédiaires entre terrestres et aquatiques, bénéficient des milieux terrestres et aquatiques, donc elles n'ont aucune limitation hydrique et ont un meilleur accès à la lumière que les plantes immergées, sont également adaptés pour résister au manque d'oxygène produit dans le sol inondé, ayant des canaux d'aération qui facilitent le passage de l'oxygène des feuilles aux racines, c'est pourquoi ils contribuent à éliminer les contaminants de l'eau, à éliminer les matières en suspension, les matières organiques, l'azote, le phosphore et les microorganismes pathogènes [103].



Figure 7. *Juncus sp.* [102].

4.3. SALICORNIA EUROPAEA

La salicorne est une plante charnue ou succulente et halophile, c'est-à-dire qu'elle pousse dans les zones où l'eau salée est concentrée; elle est distribuée sur les plages, les mangroves, les marais, les salines et les zones côtières (c'est pourquoi elle a un goût salé prononcé) [94]. On le trouve tout le long de la côte européenne, de l'Arctique à la Méditerranée, sur les rives de la mer Noire et de la mer Caspienne [95], en Afrique, dans certaines parties de l'Amérique, en Arabie saoudite et en Inde [94], il est aussi sporadiquement présent dans les salines intérieures de toute l'Europe [95], les cultures dominant aux Pays-Bas et au Portugal en raison des conditions climatiques et de la solobrité des terres qui facilite la croissance de la plante [94].

Les tiges sont généralement ligneuses dans la partie basale et charnues articulées dans le reste de la plante, les feuilles sont opposées, soudées ensemble, formant un cylindre au bord duquel se trouvent les feuilles foliaires réduites en écailles hyalines aiguës [96].

Dans la *Salicornia europaea*, elle mesure environ 35 cm de haut, et est très ramifiée, les branches inférieures peuvent devenir aussi longues que la tige principale, au moment de la floraison a une fleur centrale plus grande que la latérale [97].

Il existe plusieurs espèces telles que *Salicornia europaea*, *Salicornia ambigua* ou *Salicornia perennis*, entre autres [94]. Appartenant à la famille des Amarantheaceae, presque tous sont assez petits. Ce sont généralement des plantes herbacées, composées d'une tige horizontale et de petites tiges latérales érigées, articulées en nœuds et entre-nœuds (la plante n'a pas de feuilles en soi). Les tiges sont charnues et vertes, devenant rougeâtres à la fin de leur cycle de vie, les "feuilles" sont rassemblées en petites écailles, dont les fleurs, qui apparaissent en automne, sont très peu apparentes et sont généralement présentées en groupes de noeuds sur les tiges [95].



Figure 8. *Salicornia europaea*.

La *Salicornia europaea* possède un mécanisme de régulation de la salinité très efficace, puisque ses cellules sont capables d'éliminer l'excès de chlorure de sodium, sans perte d'eau. Grâce à cette propriété "salinity manager", il n'est pas si salé, il est donc très comestible, cuit et cru (substitut du sel). Elle contient un haut degré de protéines et d'acides gras insaturés en plus de grandes quantités de minéraux comme le calcium, le sodium, le potassium et l'iode, étant également une source importante de fibres, et un aliment pratiquement sans calories qui favorise une bonne hydratation [98, 99]. Par conséquent, au cours des dernières années est souvent incorporé dans l'alimentation des athlètes [100].

Aujourd'hui, il a commencé à être utilisé dans la production de biodiesel, grâce à son huile, étant un carburant si puissant qu'il génère une énergie similaire à celle des turbosines (utilisées dans les avions et les machines industrielles) mais 80 % plus propre que tout autre

carburant, ce qui pourrait en faire une importante source d'énergie organique pour minimiser les émissions de dioxyde de carbone dans les industries et l'aéronautique [98].

5. PARC NATIONAL DE DOÑANA

5.1. DOÑANA: ENCLAVE NATURELLE

La Réserve naturelle de Doñana est une aire protégée de plus de 108.087 hectares qui se répartit presque également entre les catégories de protection du Parc Naturel (53.835 hectares) et du Parc National (54.252 hectares). Elle est considérée comme l'une des zones naturelles protégées les plus importantes d'Europe. Elle est située dans la Communauté autonome d'Andalousie, au sud-ouest de l'Espagne, entre les provinces de Huelva, Séville et Cadix (figure 9) [104, 105], en particulier dans la pointe sud-est de la province de Huelva, au sud-ouest de Séville et au nord-ouest de Cadix, au nord de l'estuaire du Guadalquivir, entre les bouches des rivières Guadiamar, Tinto et Guadalquivir, qui est l'océan Atlantique sa limite sud [106]. Entourée de 22 centres urbains, avec une population totale de 185.000 habitants, Doñana est "menacée" par les activités urbaines, agricoles, industrielles et minières [107].



Figure 9. Emplacement du Parc National de Doñana [modifié 108].

Une longue liste de reconnaissances nationales et internationales qui soulignent l'importance de son patrimoine naturel et culturel se trouve associée à la zone naturelle de Doñana. En reconnaissance de son importance culturelle, scientifique et paysagère, et en essayant de couvrir les différents milieux naturels qui la composent, pour une meilleure préservation, est créé par le décret 2412/1969 du 16 octobre 1969, le Parc National de Doñana (PND) [104]. Avec une extension de 54.252 ha, c'est la plus grande réserve biologique d'Espagne, offrant un environnement unique en Europe pour la protection de nombreuses espèces en voie d'extinction. Elle fait partie de la Convention de Ramsar pour la protection des zones humides et est reconnue par l'UNESCO comme la première Réserve de Biosphère et a par la suite été déclarée site du Patrimoine de l'Humanité [104, 105].

Le nom Doñana fait référence à l'aristocrate espagnole Doña Ana Gómez de Silva y de Mendoza, fille de Doña Ana de Mendoza de la Cerda, communément appelée princesse d'Eboli et mariée au VII^e duc de Medina Sidonia, qui a pris sa retraite pour vivre dans ces terres au XVI^e siècle, "les terres de Doña Ana", donc Doñana [110].

5.2 ÉCOSYSTÈMES DU PARC NATIONAL DOÑANA

Le PND présente une grande variété d'écosystèmes (marais, plages, dunes mobiles, montagnes, forêts et lagunes) qui contiennent une biodiversité unique en Europe, tant en flore qu'en faune. Parmi eux, le marais, d'une superficie d'environ 30.000 hectares, inondé par les cours d'eau et les eaux pluviales, constitue un écosystème parfait pour les oiseaux migrateurs, tant européens qu'africains [104, 110].

Le PND possède une grande variété de flore et de faune, avec plus de 800 espèces de plantes, 20 espèces de poissons d'eau douce, 11 amphibiens, 21 reptiles, 37 mammifères non marins et 360 oiseaux, dont 127 se reproduire habituellement dans le parc [109, 111]. De toutes ces espèces, plusieurs sont menacées d'extinction, comme c'est le cas pour l'aigle impérial ibérique ou le lynx ibérique, le mammifère carnivore le plus menacé de la planète [110, 112].

Bien que le parc national de Doñana manque de grands reliefs, nous pouvons trouver de petites inégalités dans le terrain qui rendent possible l'existence d'écosystèmes différents et donc d'habitats différents (figures 10 et 11) [110].

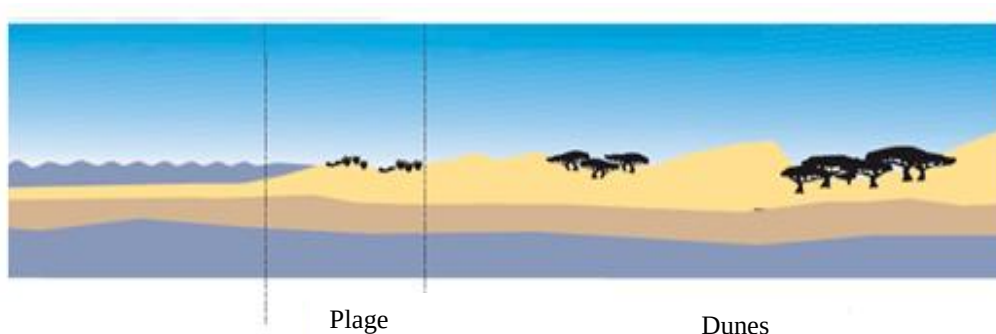


Figure 10. Cour du territoire: plage et dunes [110].

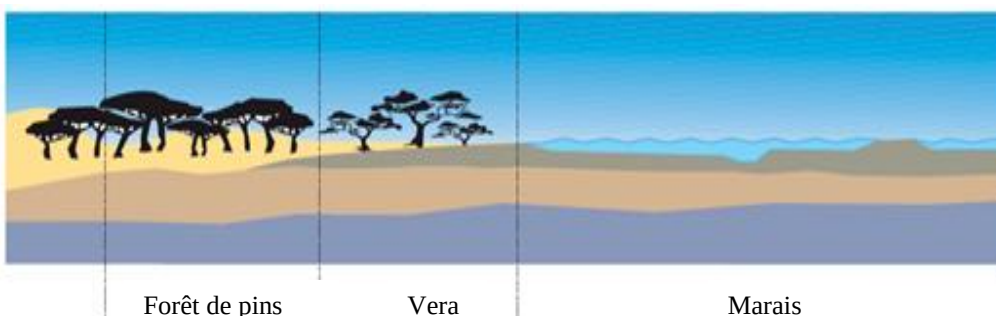


Figure 11. Cour du territoire: marais, vera et forêt de pins [110].

Les **forêts méditerranéennes de pins et de maquis** (dans la zone plate du PND) poussent principalement sur des sols sablonneux, tandis que l'immense marais est constitué d'argiles imperméables dont le régime hydrique dépend de la saison de l'année [109], c'est-à-dire qu'il se remplit d'eau en hiver et se tarit progressivement au printemps-été [104].

Parmi les écosystèmes marécageux, il convient de mentionner le **marais bas**, qui est en dessous de l'altitude moyenne, accumulant une grande quantité d'eau de pluie, ce qui réduit la salinité et prédomine une végétation formée principalement par le bayunco (*Scirpus littoralis*) et castanets (*Scirpus maritimus*) créant l'habitat idéal pour la faune aquatique tels que canards, cuillers, rabudos, friezes, frénésie, foulques, foulques et autres [110].

Près de la rivière, vous pouvez trouver des zones plus profondes qui restent inondées pendant de longues périodes, de sorte que ces lacs ont une salinité élevée, ce qui entrave la croissance de la végétation et le séchage forment une croûte de sel blanc qui est déposé sur l'argile, formant le "brochet", le plus étendu et le plus connu étant le Brochet du Coing (figure 12). Ce brochet est formé de dunes et de pinèdes. Il y a quelques années, les canaux de ruisseaux, les affluents de la rivière et les bras étaient couverts d'énées (*Typha latifolia*) et de roseaux (*Phragmites australis*) formant des pipes et créant l'écosystème idéal pour les carpes, grenouilles, butors, etc [110].



Figure 12. « Brochet du Coing ».

Le **haut marais** est maintenu pratiquement toute l'année sous forme de steppe argileuse et saline, n'étant inondé qu'en hiver, ce qui le rend peuplé de buissons et d'espèces végétales charnues comme le *Arthrocnem macrostachyum* ou le *Suaeda vera*. Il est utilisé pour la nidification de grandes colonies d'échassiers tels que cigognes, avocettes, alcaravanes, terreras et canasteras [110].

Les **veines et les vetons**, contrairement au brochet et aux cours d'eau, sont des terres qui s'élèvent au-dessus du niveau moyen et forment de petites îles qui ne sont pas inondées, sauf à certaines occasions. Les paquets, qui ont tendance à être inondés plus facilement parce qu'ils sont à une altitude plus basse que les veines et les vetos, sont l'endroit idéal pour la prolifération des plantes halophiles et donc pour abriter des espèces telles que les sternes et les pluviers, fréquentés par les lièvres et les souris sauvages en quête de nourriture [110].

La **vera** est la bande de séparation entre le marais et les réserves et dunes, ce qui rend possible la coexistence de la flore et de la faune des deux écosystèmes. Dans cette zone, la croissance des roseaux et des pâturages est facilitée par l'humidité filtrée par le sable, ce qui permet de servir ces légumes d'herbe aux cerfs et aux daims en période de sécheresse. Il y a aussi des vestiges de vieilles forêts de chênes-lièges (*Quercus suber*) connues dans le monde entier sous le nom de Pajareras de Doñana parce qu'elles permettent l'existence de grandes colonies d'élevage de hérons, de spatules, d'aigrettes et de martinets [110].

Dans les **réserves** (figure 13), la végétation prédomine, dans les zones les plus élevées et les plus sèches, on trouve des forêts de sève (*Juniperus phoeniceas sp. turbinata*). La faune est formée principalement d'herbivores et de prédateurs tels que cerfs, sangliers, lapins, loirs, belettes, dindes, meloncilles, genêts, chats sauvages, etc. C'est aussi le refuge du lynx ibérique et de l'aigle impérial [110].



Figura 13. Réserves de Doñana.

Les zones de broussailles sont divisées en trois types de montagnes :

-La **montagne blanche**, ainsi appelée à cause de la couleur blanchâtre donnée par le jaguarzo (*Halimium halimifolium*) et à cause des différents types de cistes [110].

-La **montagne méditerranéenne**, formée principalement de plantes aromatiques comme la lavande (*Lavandula stoechas*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et le thym (*Tymus tomentosus*) [110].

-La **montagne noire** composée de bruyères (*Erica sp.*), de bruyères (*Calluna vulgaris*) et de tojos (*Ulex sp.*) qui dominent les zones les plus profondes et les plus humides, entrelacées de ronces (*Rubus gr. ulmifolius*) et torviscos (*Daphe gnidium*). Il y a aussi des forêts de pins (*Pinus pinea*), de lentilles (*Pistacia lentiscus*) et de petites zones couvertes de *Phillyrea angustifolia*, de genêts (*Osyris alba*), de genêts (*Cytisus scoparius*) étant l'habitat idéal pour les milans rouge et noir, l'aigle, genêts et des fauconniers [110].

Les **dunes** (figure 14) ont leur origine dans la plage puisque les vents du Sud-Ouest empilent de petits amas de sable autour d'un buisson de barrón (*Ammophila arenaria*) ou un autre obstacle que les contributions successives feront perdre à la dune sa stabilité, commencer à se déplacer et rejoindre les autres dunes, formant de grandes dunes qui progressent parallèlement à l'intérieur sur une surface plane laissant un espace humide dehors et protégé du vent qui permet le règlement des plantes [110].



Figure 14. Dunes de Doñana.

Les corrals sont couverts de petites clavellinas (*Armeria pungens*) et de siemprevivas (*Helichrysum picardii*). Plus à l'intérieur des terres, les pinèdes colonisent le corral, ainsi que les junqueras (*Juncus sp.*), les adelfas (*Nerium oleander*) ou les fourrés de jaguar et camarinas (*Corema album*) et dans cette zone il y a une faune importante comme l'aigle serpent, l'alcotane, le hibou, le lynx, le sanglier, la tortue, la vipère, le serpent, le lapin ou le lézard [110].

5.3. POLLUTION DANS LE PARC NATIONAL DE DOÑANA

Le PND est situé sur l'aquifère d'Almonte-Marismas, situé entre les rivières Tinto et Guadalquivir, et occupe 2.500 Km² entre les provinces de Huelva et Séville. Le drainage de cet aquifère se fait par la rivière Guadiamar, les ruisseaux de La Rocina et El Partido situés au nord-ouest et les marais eux-mêmes. Autour du Parc, il y a une population de 185.000 habitants répartis dans 22 noyaux urbains [107, 113], ce qui signifie que le PND est constamment menacé par les activités urbaines, agricoles et industrielles [107, 114].

Initialement, elle était alimentée par le système hydrologique de La Rocina-Madre de la Marisma-Brazo de la Torre, qui réunissait les apports fluviaux du NO et du NE [107, 115]. Plus tard, la contribution hydraulique de la rivière Guadiamar a été largement supprimée en construisant plusieurs murs et isolant ainsi, au sud, le marais de la rivière Guadalquivir et limitant l'entrée de l'eau dans le marais, par les eaux de pluie et les ruisseaux du NO [107].

Dans la nuit du 25 avril 1998, à une 50 kilomètres au nord du PND, l'un des murs de soutènement d'un bassin de décantation contenant des déchets miniers et des eaux acides contenant une grande quantité de FeS₂ et de métaux lourds (Pb, As, Zn et Cu) provenant des mines de pyrite des Frailes à Aznalcóllar (Séville) a été brisé [109, 116, 117, 118]. Ces eaux sont tombées dans la rivière Agrio, un affluent du Guadiamar, déversant environ 2 Hm³ de

boues toxiques et environ 4 Hm³ d'eau acide, endommageant une superficie totale de 4.286 hectares, une partie du PND étant couverte de boues toxiques et d'eau acide [109, 117].

Après cette catastrophe, le Plan Doñana 2005 a été appliqué, ce qui a permis au marais de fonctionner de manière plus naturelle, en récupérant les échanges avec le Guadalquivir et ses affluents [107, 119] de sorte que le marais a cessé d'être isolé de manière osmotique, en échangeant l'eau avec les zones adjacentes, favorisant ainsi les courants marins et en empêchant la stagnation des eaux. Cependant, cette nouvelle situation a rendu le PND plus vulnérable à la pollution causée par les activités humaines environnantes [107].

Les évaluations du PND depuis l'accident d'Aznalcóllar ont également corroboré la menace que représentent les pratiques agricoles et donc l'utilisation de pesticides dans la région de Doñana [104, 107]. Le PND est menacé par les activités agricoles, un moteur très important dans l'économie de la région, mais il affecte le PND dans l'extraction des eaux souterraines pour l'irrigation, l'utilisation des eaux de surface pour les rizières et dans la contamination d'au moins 41 engrais et pesticides. Ils sont probablement la cause de la grande quantité de composés azotés présents dans les eaux souterraines [104, 107, 113]. Des valeurs élevées d'éléments nutritifs (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , NO_3^- et PO_4^{3-}) et de métaux (Al^{3+} et Cr^{3+}) ont été trouvées dans la rivière El Partido, ce qui peut être dû à l'utilisation d'engrais et de pesticides à Doñana et dans ses environs [107, 120].

Il faut aussi souligner les nombreux moulins, les industries de transformation du raisin et des légumes et les industries de la viande et des produits laitiers dans la région. Les effluents de ces industries menacent El Partido et le cours inférieur du Guadiamar. Une autre source potentielle de pollution est à 45 km au nord-ouest du PND, sur les rives de l'Odiel et du Tinto, puisque les Pôles Industriels de Huelva possèdent des industries de transformation minière, un complexe pétrochimique, une centrale thermique et une usine de cellulose, dont les polluants peuvent atteindre Doñana par voie hydraulique ou éolienne [104, 107, 115, 121, 122].

Il est donc évident que la zone de Doñana est un espace complexe où certaines des valeurs environnementales les plus précieuses coexistent avec le développement économique et social des populations environnantes [104].

La qualité des eaux de surface qui atteignent les marais du PND a toujours été une préoccupation de toutes les organisations impliquées dans la conservation de cette zone humide. Depuis les années 90, des rapports ont été établis périodiquement, mettant en garde contre le mauvais traitement des eaux usées que Doñana finit par recevoir et le risque qu'il implique sur la qualité de l'eau des marais, en réalisant différents plans de développement durable afin d'éradiquer ce problème qui, en même temps qu'il pollue les cours et marais de Doñana,

provoque indirectement des problèmes d'eutrophisation et de pollution des eaux de surface et souterraines.

Depuis quelques années, le contrôle annuel des installations d'épuration des populations environnantes est effectué conformément au décret royal 509/1996, du 15 mars 1996, qui développe le décret-loi royal 11/1995, du 28 décembre 1995, qui établit les règles applicables au traitement des eaux urbaines résiduaires, y compris dans toutes les stations d'épuration de la région de Doñana un traitement tertiaire pour l'élimination des nutriments et prévenir ainsi l'eutrophisation des rivières, ruisseaux et marais [123].

6. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est essentiellement l'ionisation d'atomes ou de molécules dans un échantillon, le plus souvent en mode positif, à séparer ultérieurement en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Cette technique, combinée aux techniques de séparation haute résolution, est la plus spécifique pour analyser des échantillons complexes réels, car elle permet d'obtenir une grande quantité d'informations des fragments ioniques de l'analyte. Il possède une sensibilité élevée, permettant la détection de molécules en quantités d'atomes (10^{-18} moles) et de femtomoles (10^{-15} moles) [124].

La grande versatilité de cette technique analytique permet de déterminer la structure de composés très divers et est applicable aux échantillons volatils, non volatils, polaires, apolaires, solides, liquides et gazeux [124].

La spectrométrie de masse (MS) a été intégrée au domaine de l'analyse biomoléculaire à la fin des années 1970 avec l'apparition de diverses techniques d'ionisation douce, telles que la désorption du champ électrique (FD), la désorption plasmatique (PD) et le (*Fast atom bombardment*, FAB), cette dernière étant une méthode d'ionisation douce qui résulte de la combinaison de la désorption de l'analyte d'une phase condensée (mélange d'analyte solide + matrice) avec son ionisation ultérieure [125, 126]. C'est la première méthode d'ionisation qui a permis l'analyse de routine par spectrométrie de molécules de masse polaire [126]. Dans la MS, les ions en phase gazeuse sont générés directement à partir d'une solution en phase liquide de l'analyte, de sorte que les différentes formes de vaporisation et d'ionisation de l'analyte sont devenues une étape liée dans le processus total d'analyse par spectrométrie de masse. Plus tard, au début des années 1990, la FAB a été remplacée par l'introduction de deux méthodes d'ionisation douce, telles que l'électrospray (ESI) et la désorption laser assistée par matrice (MALDI), cette dernière étant un

des piliers fondamentaux de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans les études protéomiques [125, 126].

La spectrométrie de masse, combinée aux techniques de séparation à haute résolution, est aujourd'hui la plus adaptée à l'analyse d'échantillons complexes et se fait en quatre étapes :

- 1.- Présentation de l'échantillon.
- 2.- Ionisation de l'échantillon, c'est-à-dire perte d'électrons ou de protons pour convertir les atomes ou molécules en espèces ioniques en phase gazeuse.
- 3.- Séparation et analyse, selon leur rapport m/z , des ions moléculaires et des fragments chargés produits.
4. Obtention du spectre de masse, dans lequel l'abondance relative des ions et/ou fragments séparés par rapport au rapport masse/charge est présentée. Les informations de ce spectre sont principalement qualitatives, telles que la détermination de la masse moléculaire ou des informations sur la structure à partir des fragments obtenus, mais des analyses quantitatives peuvent également être réalisées en utilisant des étalons internes ou externes avec des limites de détection allant du picomole à la femtomole [124].

Le signal correspondant à un ion donné se présente sous la forme de plusieurs pics appartenant à la distribution statistique des différents isotopes de l'ion [124], l'ion moléculaire (M^+) étant le pic le plus lourd du spectre qui représente normalement la molécule "mère" moins un électron et offre l'information la plus précieuse dans le spectre de masse, puisque sa masse et sa composition élémentaire indiquent les limites dans lesquelles les fragments structuraux détectés dans le spectre doivent se retrouver [124, 127].

Selon le type d'instrument, la méthode d'ionisation et sa capacité à appliquer le balayage de potentiel, les caractéristiques des spectromètres de masse varient en termes de pouvoir de résolution, de sensibilité et de précision de la mesure de masse, car aucun instrument ne fournit simultanément les meilleures performances [124]. L'analyse de l'information sur le spectre de masse consiste théoriquement à regrouper les fragments pour reconstituer la molécule d'origine [127].

L'analyseur constitue le noyau d'un spectromètre de masse, et son but est de séparer les ions selon leur relation m/z et de focaliser les ions séparés vers un point spécifique, de telle sorte que le mouvement des particules chargées permette de les distinguer selon l'énergie cinétique de chaque ion, la vitesse ou le moment des forces [124]. Il existe différents types d'analyseurs, les plus utilisés pour l'analyse des biomolécules sont ceux de **secteur magnétique**,

quadrupôle, piège à ions, piège à ions linéaire, piège à ions, temps de vol ou résonance ionique cyclotronique, dont le choix varie selon sa résolution dans l'intervalle des masses qui peuvent être séparées, la précision des masses qui peuvent être séparées, la dynamique ou intervalle linéaire, la vitesse de balayage, sensibilité, efficacité et adaptabilité, soit la possibilité de faire intervenir différents modes d'ionisation. Dans certains cas, il est nécessaire d'utiliser le couplage de deux analyseurs car, dans de nombreux cas, il n'est pas possible d'avoir un analyseur qui réponde aux attentes analytiques souhaitées pour des échantillons complexes [124].

L'analyseur de piège à ions (figure 15) permet le confinement des ions dans une petite chambre à l'aide de champs électriques (*Paul trap* ou *iontrap*, *Orbitrap*) ou magnétiques (*analyseur à résonance ionique par cyclotron à transformée de Fourier*, FT-ICR). Cet analyseur stocke, sélectionne et analyse les ions formés dans le même piège ou dans des sources d'ionisation externes [125]. L'espace où les ions sont piégés est défini par les surfaces hyperboliques de trois électrodes : un anneau central circulaire et deux couvercles latéraux avec de petits trous au centre pour l'entrée des ions dans la source et leur sortie ultérieure vers le détecteur [125, 128].

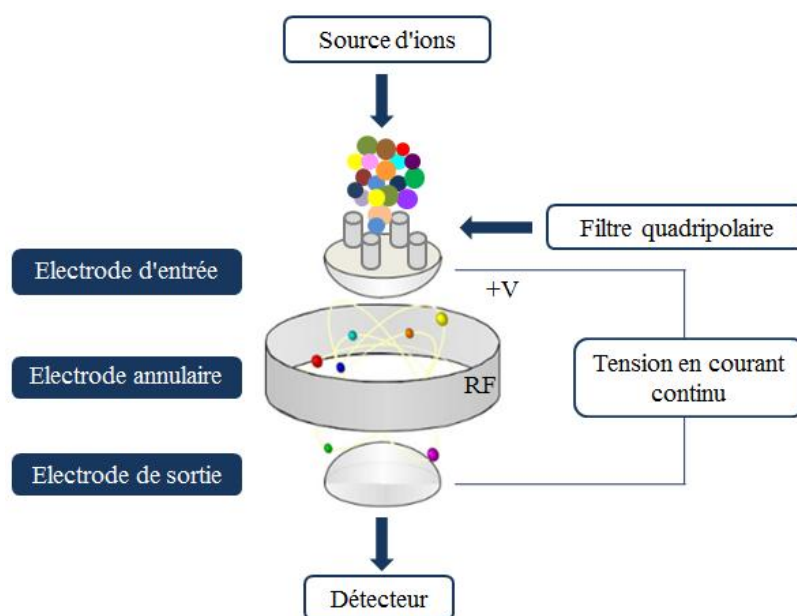


Figure 15. Analyseur de pièges à ions.

Dans l'**analyseur piège à ions linéaire**, le confinement des ions peut être réalisé dans des systèmes quadripolaires munis à leurs extrémités d'électrodes terminales de même géométrie, mais plus courtes et isolées électriquement, de sorte que ces électrodes sont appliquées un potentiel qui agit comme une barrière pour les ions emprisonnés à l'intérieur. De plus, le piège à ions linéaire peut être utilisé comme un quadripôle conventionnel, ce qui lui permet de

fonctionner dans n'importe lequel des modes de spectrométrie de masse en tandem possibles dans ce type d'instrument (balayages précurseurs, pertes nettes et ions produits), en dehors des modes du piège lui-même [125].

L'analyseur Orbitrap a été développé et breveté par Makarov à la fin des années 1990 [125, 129] et se compose de deux électrodes (un tubulaire externe et un filament coaxial interne) qui piègent les ions dans le champ électrostatique formé entre eux. Le filament interne est devenu une barre en forme de fuseau, acquérant les parois du cylindre qui le contient dans la même forme [125, 130] c'est pourquoi les ions, lorsqu'ils sont introduits perpendiculairement dans ce système, effectuent un mouvement radial autour de la broche coordonné avec un mouvement axial périodique dont la fréquence est fonction de sa valeur m/z . D'autre part, l'électrode externe est divisée en son centre et perpendiculairement en deux moitiés, ce qui fait que le mouvement périodique des paquets d'ions d'un côté à l'autre de la cavité pousse entre ces deux moitiés un signal image dont la fréquence est mesurable pour déterminer la valeur correspondante m/z . Cependant, dans la pratique, le signal enregistré est un signal complexe ou interférogramme créé par la combinaison de signaux sinusoïdaux de fréquences (m/z) et d'intensités (abondance) différentes de chacun des ions, mais l'application de la transformée de Fourier à ce signal permet de déterminer la fréquence dérivée de chacun des ions et acquérir le spectre de masse [125].

L'analyseur quadripolaire (figure 16) se compose de quatre barres parallèles, auxquelles un potentiel combiné de courant continu et de radiofréquence est appliqué, créant un champ appelé quadripôle. De cette façon, les ions produits dans la source passent longitudinalement à travers l'enceinte limitée par ces barres pour pénétrer dans le détecteur. Les ions qui entrent dans l'analyseur à une énergie de quelques électrovolts sont soumis à l'effet du champ quadripolaire qui les fait osciller et les détourne en fonction de leur valeur m/z , de sorte que pour une combinaison de potentiels qui provoque seulement les ions dans une gamme étroite de valeurs m/z viennent affecter le détecteur [125].

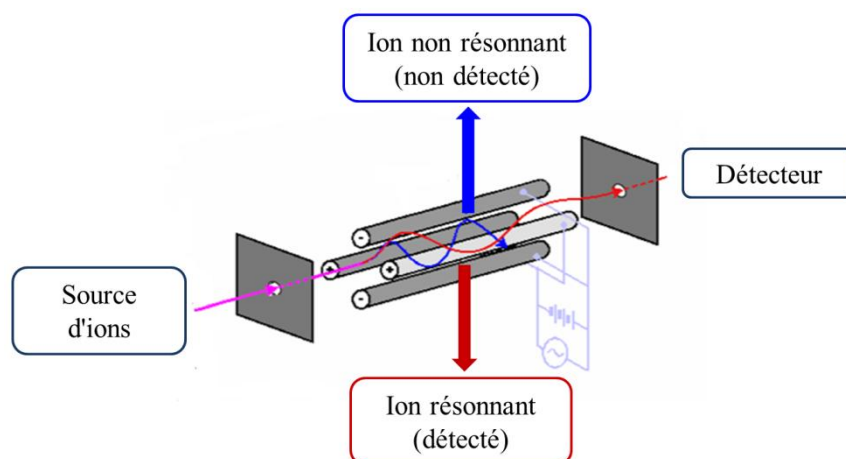


Figure 16. Analyseur quadripolaire [modifié 131].

L'**analyseur TOF** (figure 17) est basé sur l'accélération des ions grâce à un champ électrique acquérant des vitesses différentes en fonction de la valeur de sa relation m/z , prenant des temps différents pour parcourir une distance déterminée, sans que les ions soient en présence d'un champ électrique et/ou magnétique. Ainsi, la charge et l'énergie cinétique des ions formés à la source étant constantes, la mesure du temps de vol permet de déterminer très précisément la masse de chacun de ces ions [125]. Par conséquent, ce type d'analyseurs présente une haute résolution et précision de détermination de masse, atteignant des valeurs de l'ordre de parties par million, ce qui en fait l'un des analyseurs les plus simples et utilisés dans les laboratoires aujourd'hui [124].

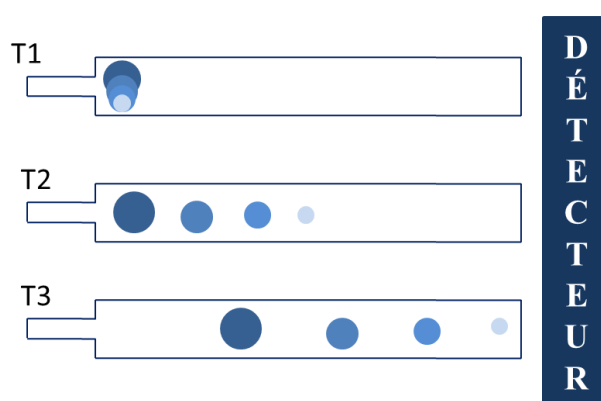


Figure 17. Analyseur temps de vol [modifié 124].

Quant à l'**ionisation de l'échantillon**, elle peut se faire de plusieurs façons :

L'impact électronique (*Electron Impact*, EI) ou l'ionisation électronique (*Electron Ionization*, EI) est une méthode classique pour générer des ions en spectrométrie de masse. L'analyte est introduit dans la source, qui est située à un vide inférieur à 10^{-6} mbar et ensuite ionisée par collision avec un flux d'électrons à 70 eV, généré par émission thermique d'un filament chaud (tungstène ou rhénium) [126].

L'ionisation chimique (*Chemical Ionization*, CI) est une méthode d'ionisation relativement douce. C'était la première méthode d'ionisation utilisée en spectrométrie de masse. L'ionisation est affectée par les réactions de la molécule avec les ions d'un réactif gazeux généré par l'ionisation électronique par impact (EI) [126].

L'ionisation par électrospray (*Electrospray ionization*, ESI) est probablement la méthode d'ionisation la plus développée et la plus utilisée en spectrométrie de masse en raison de sa grande capacité à ioniser des molécules hautement polaires ainsi que des peptides, oligonucléotides et oligosaccharides. Elle s'effectue à la pression atmosphérique et à la température ambiante, tandis que les autres méthodes utilisent des températures élevées. Le processus général d'électrospray se déroule à l'extrémité d'un capillaire ou d'une aiguille, de sorte qu'une solution aqueuse, acide ou basique (selon l'échantillon), qui présente une conductivité électrique, est micronisée de l'extrémité de l'émetteur dans laquelle un potentiel de 3-4 kV est appliqué, afin que le liquide qui commence à sortir par l'aiguille, augmente sa charge et acquiert une forme conique appelée "cône de Taylor". A l'extrémité du cône, le liquide se transforme en une fine ligne, devenant instable lorsqu'il est forcé de retenir de plus en plus de charge, atteignant un point critique, où il ne peut supporter plus de charge électrique, dispersant ainsi la solution sous forme de brouillard de petites gouttes (moins de 10 μm de diamètre), très chargées, qui volent à la recherche d'une surface opposée pour charger [126].

Les systèmes quadripolaires ou sectoriels filtrent des groupes d'ions dans une petite plage de valeurs m/z à chaque instant, éliminant ainsi le reste de la population ionique, tandis que l'analyseur TOF sépare et détecte sur une échelle (temps de vol) l'ensemble des ions provenant de la source, de sorte que le système fonctionne en régime discontinu et est donc un détecteur indiqué pour les techniques d'ionisation pulsante telles que MALDI [125].

Le couplage du TOF à des sources d'ions de production continue, comme l'ESI, s'effectue au moyen de systèmes intermédiaires de confinement d'ions qui, au moyen de champs électriques, accumulent et injectent, perpendiculairement à la trajectoire initiale, des paquets d'ions dans l'analyseur en cycles avec une fréquence de l'ordre du KHz. Le TOF est un

analyseur relativement simple et peu coûteux avec un cycle de balayage rapide et une plage de masse théoriquement illimitée [125, 132].

La section suivante décrit les enzymes utilisées dans cette thèse, ainsi que leurs inhibiteurs les plus fréquents, pour lesquels il est nécessaire de connaître d'abord le mécanisme d'action des enzymes et les différents types d'inhibiteurs.

7. ENZYMES: STRUCTURE ET MODE D'ACTION

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques, c'est-à-dire des substances qui, sans être consommées dans une réaction, augmentent notablement leur vitesse sans altérer l'équilibre de ces réactions ni l'équilibre énergétique, n'accélèrent que le processus qui pourrait se produire spontanément, puisque la transformation du réactif en produit n'est pas directe, mais il existe une étape intermédiaire dans laquelle le réactif est activé et ses liaisons sont affaiblies, appelée complexe activé, étant nécessaire une énergie d'activation pour arriver à ce complexe. Pratiquement toutes les fonctions cellulaires, directement ou indirectement, nécessitent la présence d'enzymes pour que les réactions chimiques qui sont responsables de ces fonctions se produisent à une vitesse adéquate [133, 134, 135].

Les enzymes sont des protéines, les protéines sont formées par des acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques, ces acides aminés peuvent avoir des chaînes latérales différentes selon la charge ou la polarité qu'ils présentent au pH physiologique, qu'elles soient grandes ou petites, acides ou basiques, hydrophiles ou hydrophobes [134, 136].

Dans toutes les réactions biochimiques catalysées par les enzymes, il y a association de l'enzyme et du substrat (substance sur laquelle l'enzyme agit), formant ainsi le complexe enzyme-substrat, nécessaire pour que la réaction ait lieu, ce complexe peut aussi réduire l'énergie d'activation en modifiant la conformation du substrat, de façon à faciliter la rupture des liaisons, qui aide à atteindre l'état de transition représenté par l'équation [134, 137, 138] :



Où E est l'enzyme, S est le substrat ou le réactif, P est le produit de la réaction et ES est le complexe enzyme-substrat intermédiaire. La figure 18 montre le schéma de formation du complexe enzyme-substrat [134, 137].

Contrairement aux catalyseurs inorganiques, les enzymes catalysent des réactions spécifiques, agissant sur une substance appelée substrat, catalysent un seul type de réaction, agissant presque toujours sur un seul substrat ou sur un très petit groupe de substrats [134, 137].

Le centre actif est une région de l'enzyme qui se lie au substrat étant spécifique et exclusive à chaque enzyme [134, 138]. Il tire ses propriétés des acides aminés qui la conforment, la position que les acides aminés acquièrent dans l'espace tridimensionnel donne forme, taille, comportement chimique du site catalytique (formé par les acides aminés directement impliqués dans le mécanisme de la réaction), facilitant l'association de l'enzyme avec le ou les substrats, puisqu'un espace est généré dans lequel le substrat s'ajuste et les acides aminés qui ont des radicaux ayant une affinité chimique pour le substrat sont proches par les plis de la chaîne polypeptidique (bien qu'ils étaient loin dans la chaîne originale) attirant et générant des liens faibles avec le substrat, lorsque ces liens sont brisés, les produits sont séparés du centre actif, de sorte que l'enzyme peut recommencer le cycle réactionnel [134, 138].

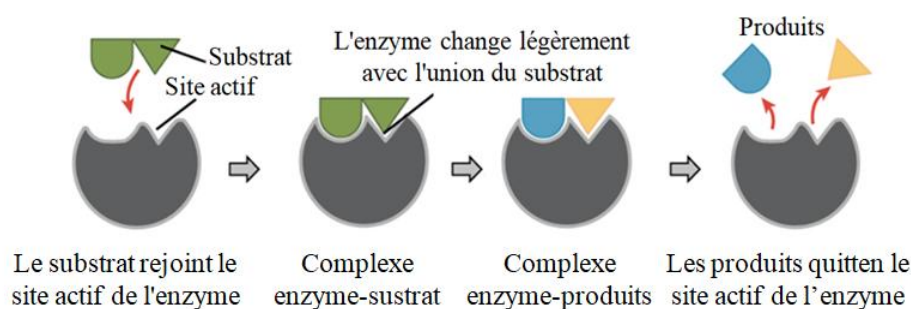


Figure 18. Formation du complexe enzyme-substrat [modifié 139].

La coïncidence entre le substrat et le site actif de l'enzyme n'est pas seulement due à la correspondance de deux pièces comme s'il s'agissait d'un puzzle (modèle appelé "clé et verrou"), en réalité l'enzyme modifie légèrement sa forme une fois fixée au substrat, entraînant un ajustement encore plus précis, appelé ajustement induit [138].

Certaines enzymes accélèrent les réactions chimiques en rapprochant deux substrats l'un de l'autre avec la bonne orientation, d'autres créent un environnement favorable à la réaction dans le site actif et beaucoup d'autres diminuent l'énergie d'activation en faisant partie des réactions chimiques, ce qui signifie que les résidus du site actif favorisent la formation de liaisons covalentes temporaires avec les molécules du substrat dans le cadre du processus de réaction [134, 137, 138].

Dans tous les cas, à la fin de la réaction, l'enzyme retourne à son état initial, elle ne reste pas attachée aux molécules avec lesquelles elle réagit, en fait une propriété caractéristique des enzymes est qu'elles ne sont pas altérées par des réactions de catalyse lorsqu'une enzyme termine de catalyser une réaction, ne libère que le produit (ou les produits) et est prête pour le cycle de catalyse suivant, de même que les enzymes forment souvent des complexes multienzymatiques, de sorte que le produit d'une enzyme constitue le substrat de la suivante, donc aucune concentration élevée du substrat n'est nécessaire [134, 139].

Les enzymes sont responsables de la réduction de l'énergie d'activation, c'est-à-dire de la quantité d'énergie qui doit être ajoutée ou fournie à une réaction pour qu'elle commence, atteignant ainsi plus facilement le complexe activé permettant à la réaction d'avoir lieu, car sans la présence de l'enzyme ne serait pas possible d'atteindre l'état de transition, un état instable par lequel doivent passer les réactifs pour devenir produits [134, 138, 139].

Les enzymes métaboliques sont classées en six grands groupes, dont les noms sont complétés par le suffixe-ase, selon le nom du substrat avec un terme qui décrit la réaction qu'ils catalysent, ayant ainsi les enzymes hydrolases, isomérases, ligases, baux, oxydoréductases et transférases [134, 138].

-Hydrolases : Elles sont responsables de catalyser les réactions d'hydrolyse, d'extraire les liaisons des atomes d'azote et de carbone ou d'oxygène, c'est-à-dire de rompre les liaisons en ajoutant de l'eau, cette classe comprend les enzymes digestives, au sein desquelles se trouvent des protéines comme la trypsine, la chimiotrypsine et la pepsine fondamentales pour le processus digestif [138, 139].

-Isomérases : Elles catalysent des réactions dans lesquelles un isomère est transformé en un autre, en d'autres termes, le transfert d'un groupe à l'intérieur de la même molécule [134, 138].

-Ligases : Contrairement aux autres, au lieu de rompre les liens, ils catalysent l'union des molécules, produisant la formation de liens par des réactions de condensation [138].

-Lyases : Elles agissent directement sur les liaisons, c'est-à-dire qu'ils catalysent les réactions dans lesquelles les groupes sont éliminés pour former ou ajouter un double lien, comme les enzymes comme les décarboxylases, les hydratases, les déshydratases ou les désaminases [138].

-Les oxydoréductases : Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction, facilitant le transfert des électrons d'une molécule à l'autre, comme la déshydrogénase alcoolique qui catalyse l'oxydation de l'éthanol et d'autres alcools [138].

-Transférases : Elles catalysent le transfert d'un groupe de molécules d'une substance à l'autre, agissant sur différents substrats par transfert de groupes amino, carbonyle, carboxyle, phosphoryle, méthyle et aciryle. C'est le cas de la transméthylase, une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupe méthyle d'une molécule à une autre [138].

7.1. COFACTEURS

Toutes les enzymes sont des protéines globulaires (à l'exception des ribozymes) et peuvent être formées exclusivement par des chaînes polypeptidiques ou contenir un autre groupe non protéique, selon la structure des enzymes, il est possible de différencier les holoprotéines, les enzymes formées uniquement par des polypeptides et les haloenzymes formées par la liaison entre une partie (ou apoenzyme) polypeptidique et une partie ou cofacteur non-polipeptidique [138, 142].

L'apoenzyme est la partie protéique qui fournit la structure spatiale spécifique permettant la liaison aux substrats, tandis que le cofacteur (ou coenzyme) forme la partie non protéique chargée de réaliser la réaction enzymatique, celles-ci peuvent être inorganiques ou organiques de faible poids moléculaire comme les vitamines du groupe B, alors que les cofacteurs inorganiques favorisent l'activité catalytique de l'enzyme, sans leur présence l'enzyme n'agirait pas, c'est à cause d'eux qu'ils sont aussi appelés activateurs, tels que les ions métalliques comme Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , etc. [134, 138, 142].

8. INHIBITEURS ENZYMATIQUES

Les inhibiteurs enzymatiques sont des molécules qui se lient aux enzymes pour diminuer leur activité, car cela n'est pas toujours biologiquement utile et peut avoir des conséquences fatales pour l'organisme, comme c'est le cas de nombreux traitements cliniques basés sur l'inhibition enzymatique, de nombreux antibiotiques et autres médicaments réduisent ou éliminent l'activité de certaines enzymes, par exemple l'aspirine, qui empêche la première enzyme dans la synthèse des prostaglandines. Par conséquent, la nature a développé un grand nombre d'inhibiteurs enzymatiques qui ralentissent ou annulent complètement l'activité enzymatique [134, 138].

L'inhibiteur en se liant à l'enzyme bloque l'entrée du substrat sur le site actif de l'enzyme, empêchant la réaction catalytique correspondante d'avoir lieu, une telle liaison peut être réversible ou irréversible [134]. Il y a des cas où un effet allostérique peut être produit, c'est-à-dire que l'inhibiteur se joint à un autre site qui n'est pas le site actif de l'enzyme, cette union de l'inhibiteur avec le site allostérique provoque le changement de conformation de l'enzyme, augmentant ou réduisant la vitesse de liaison au substrat [138].

La validité d'un inhibiteur d'enzyme est déterminée par sa spécificité (absence de liaison à d'autres protéines) et sa puissance (sa constante de dissociation, qui indique la concentration nécessaire pour inhiber une enzyme) [138].

Les inhibiteurs irréversibles réagissent avec l'enzyme de façon covalente, c'est-à-dire qu'ils modifient la structure chimique de l'enzyme et modifient le niveau des résidus d'acides aminés nécessaires à son activité enzymatique. Bien que les inhibiteurs réversibles se lient à l'enzyme de manière non covalente (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes ou liaisons ioniques), les multiples liaisons faibles qui se produisent entre l'inhibiteur et le site actif se combinent pour produire une liaison spécifique forte [134, 138].

8.1. TYPES D'INHIBITEURS RÉVERSIBLES

On peut distinguer trois types d'inhibitions réversibles selon l'effet produit par la variation de la concentration du substrat enzymatique dans l'inhibiteur et selon que l'inhibiteur se lie à l'enzyme, au complexe enzyme-substrat ou aux deux [138].

-Inhibition compétitive (figure 19) : Le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le site actif, ont tous deux une structure similaire et ont la même affinité pour le site actif d'une enzyme, mais ne peuvent se lier à la même enzyme en même temps. Ce type d'inhibition peut être surmonté avec des concentrations élevées du substrat, laissant ainsi l'inhibiteur hors compétition [138, 139].

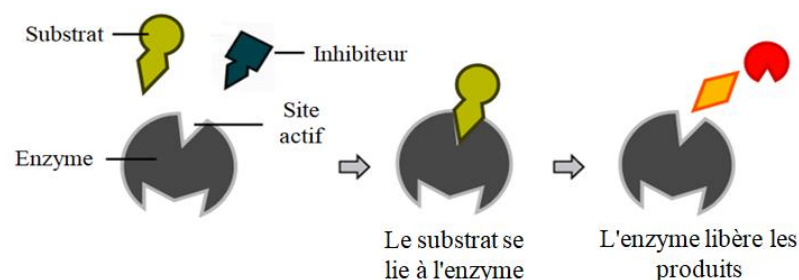


Figure 19. Inhibition compétitive.

-Inhibition incompétitive : C'est un type d'inhibition non compétitive, l'inhibiteur n'a aucune affinité pour la molécule d'enzyme libre, se lie seulement au complexe enzyme-substrat (ES), l'empêchant de continuer le processus et de former le produit. [134, 138].

-Inhibition non compétitive (figure 20) : L'inhibiteur se lie à l'enzyme libre et entre en compétition avec le substrat pour l'occupation du site actif, se lie à l'enzyme en des points autres que le centre actif, sa liaison empêche l'enzyme de développer son action catalytique et dans ce cas, l'augmentation de la concentration du substrat n'inverse pas l'inhibition, donc le degré d'inhibition dépend seulement de la concentration de l'inhibiteur [134, 138].

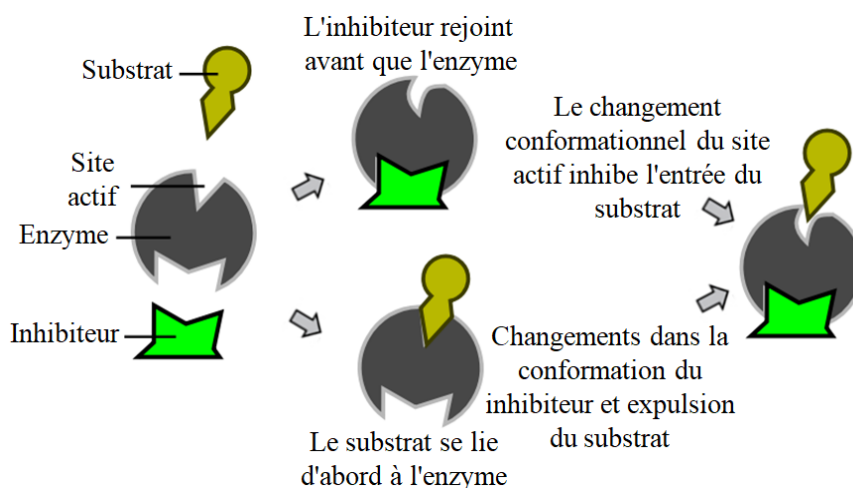


Figure 20. Inhibition non compétitive.

9. ENZYME COLLAGÉNASE

Les enzymes protéolytiques sont responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques et des protéines, elles sont classées en deux groupes, les exopeptidases agissent sur les liaisons peptidiques aux extrémités de la chaîne et les endopeptidases qui agissent dans la chaîne, développant une fonction dégradante dirigée vers la matrice extracellulaire et sont groupées selon le résidu catalytique primaire qu'elles possèdent, dans lesquels sont les métalloprotéases (MMPs), qui se caractérisent en ayant un atome métallique comme résidu catalytique primaire. L'enzyme collagénase appartient à cette famille puisqu'elle présente un atome de Zn^{+2} dans le centre catalytique [148, 149].

Le collagénase agit principalement sur la peau humaine, il y a ici des preuves d'une production accrue de MMPs, comme cela se produit dans la réparation dermique, le traitement des brûlures et des ulcères, l'enlèvement des tissus cicatriciels et la transplantation d'organes [150].

De même, il a été démontré que la collagénase favorise la prolifération et la migration des kératinocytes et des fibroblastes, ainsi que la destruction des tissus morts ou la création d'une nouvelle matrice extracellulaire [151].

Les collagénases sont des protéines qui dégradent le collagène dans leur conformation native de triple hélice dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire qu'elles participent aux processus physiologiques dont dépend l'intégrité du collagène ou son réarrangement, elles ont la capacité de briser les liaisons peptidiques du collagène dans un pH physiologique neutre provenant d'un point unique de la triple hélice à proximité du bout N terminal, produisant deux fragments, l'un de 75 % de la longueur du collagène et l'autre de 25 % [152], ces enzymes aident donc à créer du collagène par excision du pro-collagène, précurseur du collagène, une fois celui-ci sécrété par la cellule [152, 154].

Ils sont formés principalement de collagène interstitiel de type I et III, présent dans le derme, le collagène étant la protéine fibrillaire la plus abondante dans le corps humain, formant une partie vitale de la matrice extracellulaire des animaux dans la viande et du tissu conjonctif dans le corps [154]. Ainsi, la collagénase de type I divise les extrémités terminales de la chaîne du collagène, tandis que la collagénase de type II fragmente l'intérieur de la chaîne [155].

9.1. STRUCTURE DE L'ENZYME COLLAGÉNASE: SITE ACTIF

Dans la peau humaine, trois collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) ont été identifiées comme capables d'initier la dégradation du collagène fibrillaire de type I. La collagénase interstitielle MMP-1 est la première enzyme découverte dans la famille MMP à être définie par sa capacité à dégrader les triples hélices du collagène qui sont résistantes à la plupart des protéines [154].

La collagénase interstitielle dégrade les collagènes de type I, II, III, VII et X (mais ne dégrade pas le collagène de type IV et V) au pH et à la température physiologique. L'enzyme catalyse une seule excision à trois quarts de l'extrémité amino terminale dans chacune des trois chaînes polypeptidiques comprenant la triple hélice, un monomère naturel du collagène [154].

Comme mentionné précédemment, l'enzyme collagénase présente un atome de Zn^{+2} dans le centre catalytique qui, étant le composé le plus abondant dans les cellules, joue un rôle primordial dans le fonctionnement de plus de trois cents enzymes qui stabilisent la double hélice de l'ADN et intervient dans le contrôle de l'expression génétique, faisant intervenir les MMPs dans différents processus physiologiques et pathologiques de l'organisme, capables de dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif. Ils contiennent tous un peptide signal, un propeptide et un domaine catalytique amino terminale contenant le site fixateur du zinc [154,156].



Figure 21. Structure du domaine MMP [modifié 154].

Les MMP sont des substrats de protéines de matrice extracellulaire (MEC), de sorte que par l'activation d'une molécule de liaison au zinc, ils cassent les substrats des protéines de la matrice, car ils ont la capacité d'éliminer les protéines endommagées et de dégrader les composants MEC, cette activité enzymatique est régulée à tout moment par des inhibiteurs endogènes (TIMPs) [149, 154].

9.2. INHIBITEURS DE L'ENZYME COLLAGÉNASE

Plusieurs inhibiteurs synthétiques capables d'inhiber les MMP ont été développés, la classe des composés à base d'acide hydroxamique (hydroxamates) a été la plus étudiée, car leur groupe acide hydroxamique (CONHOH) agit comme une liaison bidentée avec l'ion zinc présent dans les MMPs, permettant une interaction beaucoup plus forte avec le récepteur que celle des autres inhibiteurs [157]. Dans le concept de Cathepsine K (Cat K), il s'agit d'une cystéine protéase et d'un médicament fourni pour les troubles squelettiques, connu pour sa puissante activité collagène et élastase, la formation de complexes CatK oligomères en présence de glycosaminoglycanes est associée à une activité collagénasique. Les inhibiteurs qui interrompent ces complexes peuvent bloquer sélectivement l'activité de l'enzyme collagénase sans entraver les activités protéolytiques qui régulent l'enzyme [158].

10. ENZYME TYROSINASE

La tyrosinase est une enzyme du cuivre appartenant au groupe des monooxygénases présentes dans les tissus végétaux, animaux et humains qui catalyse l'hydroxylation des monophénols et l'oxydation des o-diphénols en o-quinols, une réaction qui rend cette enzyme essentielle à la production de pigmentation de la peau, de mélanine et la couleur noire de certains légumes pelés lorsqu'ils sont exposés à l'air : La coloration est due à la transformation chimique de la tyrosine en mélanines qui sont les pigments colorés [143, 144].

La mélanine est un pigment produit dans deux types de cellules par l'action de la tyrosinase qui transforme successivement le réactif initial (l'acide L-Tyrosine) en une série d'intermédiaires (L-DOPA) pour finalement former la mélanine [143]. La mélanine est produite dans les mélanocytes (que l'on trouve dans différentes parties du corps, principalement la peau et les cheveux) et dans les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (bas de la rétine) et s'accumule dans les mélanosomes, bien que les tyrosinases diffèrent selon l'espèce par leurs propriétés structurales, leur distribution dans les tissus et leur localisation cellulaire [143, 144].

Cette enzyme régule la quantité de mélanine produite puisque son accumulation excessive produit certains désordres de la peau, tels que les taches de vieillesse ou les taches solaires, l'enzyme est également responsable de l'albinisme, (produit des changements ou altérations des gènes qui fournissent des informations génétiques dans l'enzyme, une anomalie dans un de ces gènes, rend l'enzyme tyrosinase non fonctionnelle, produisant une diminution dans mélanine et donc l'albinisme cause) [143, 144].

D'autres enzymes ne modifient que le type de mélanine synthétisée par la voie biochimique de la pigmentation, c'est pourquoi son inhibition est devenue l'une des stratégies les plus importantes pour le développement de nouveaux agents dépigmentants, ayant une grande importance dans les produits médicaux et cosmétiques, c'est donc une enzyme très étudiée depuis quelques années [144].

10.1. STRUCTURE DE L'ENZYME TYROSINASE: SITE ACTIF

Le site actif de la tyrosinase présente deux atomes de Cu^{+2} , avec un indice de coordination 5 (figure 22), qui se lie au fléau des résidus d'histidine. Dans la figure 23, les points rouges représentent les atomes de Cu^{+2} .

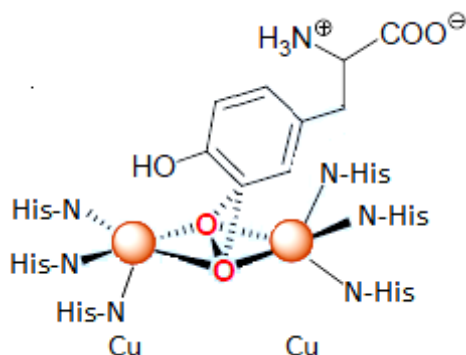


Figure 22. Coordination du site actif des atomes de Cu^{+2} [145].

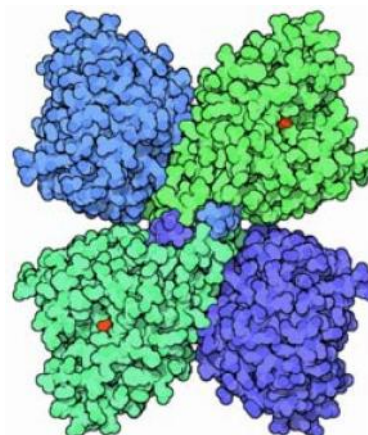


Figure 23. Structure de l'enzyme tyrosinase [145].

La tyrosinase catalyse deux étapes de la même réaction pour former la mélanine :

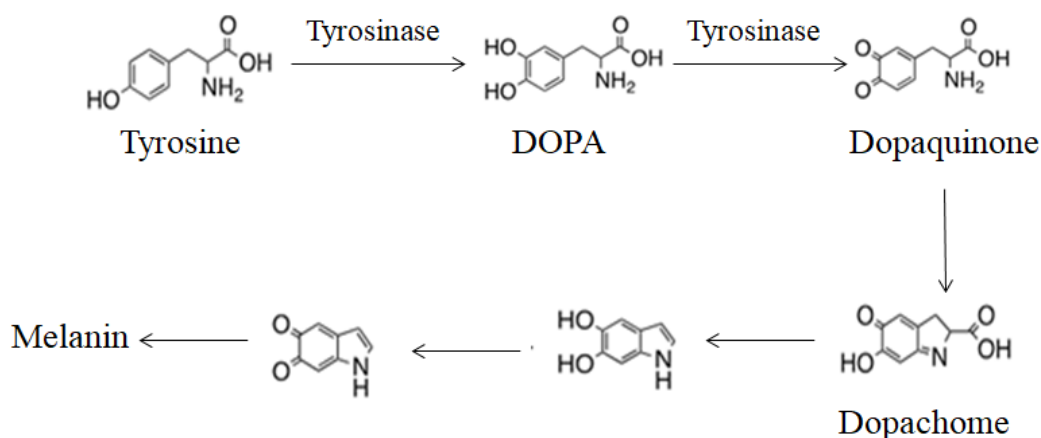


Figure 24. Réaction simplifiée pour la formation de mélanine [modifié 143].

10.2. INHIBITEURS DE L'ENZYME TYROSINASE

L'enzyme tyrosinase a été isolée à partir de différentes sources, c'est pourquoi plusieurs sources naturelles ont également été utilisées pour obtenir des composés inhibiteurs de l'enzyme. Parmi les groupes fondamentaux figurent les champignons, les bactéries et les plantes. Parmi les inhibiteurs de tyrosinase connus aujourd'hui, on trouve des inhibiteurs isolés de champignons, comme l'acide azélaïque ou l'acide kojique et des inhibiteurs dérivés de l'hydroquinone, comme l'arbutine [144].

L'acide azélaïque (acide 1,7-heptanodicarboxylique, AZA) est un composé naturel à chaîne linéaire et saturée qui est produit par lipoperoxydation des acides gras libres et estérification cis par la levure *Pityrosporum ovale*. Ce composé bloque l'accès de la tyrosine au site actif de l'enzyme en

se liant à des groupes amino ou carboxyliques, se comportant ainsi comme un inhibiteur compétitif [144, 146].

L'acide kojique, [5-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-g-pyrone], est un métabolite des champignons produits par certaines espèces d'*Aspergillus*, et *Penicillium*, est un bon agent chélatant des métaux de transition et un bon capteur de radicaux libres. Il inhibe la tyrosinase de plusieurs espèces d'*Aspergillus*, *N. crassa* et champignons, ainsi que de certaines plantes et crustacés par chélation du cuivre du site actif de l'enzyme. Il exerce également une opposition à la tyrosinase chez certaines espèces telles que l'*Aspergillus*, *N. crassa* et les champignons, de sorte que certaines plantes et crustacés par chélation du cuivre du site actif de l'enzyme, montre une inhibition compétitive avec la L-Tyrosine et non compétitive avec la L-DOPA [147].

L'arbutine est une hydroquinone bêta-glucoside naturel qui inhibe la tyrosinase de façon compétitive et réversible sans affecter le processus de transcription de l'ARNm des mélanocytes humains cultivés à des concentrations non toxiques. Elle est présente naturellement chez *Arctostaphylos*, *Vaccinus*, *Pyrus* et *Lathyrus*. Ce composé inhibe également la maturation des mélanosomes et est moins toxique pour les mélanocytes que l'hydroquinone. Malgré l'innocuité de l'arbutine comme agent de blanchiment de la peau et pour minimiser les lésions hyperpigmentées, certaines études ne confirment pas ses effets dans les essais cliniques [144, 147].

En plus des inhibiteurs mentionnés jusqu'à présent, les inhibiteurs pharmaceutiques comprennent le captopril, un antihypertenseur antihypertenseur [(2S)-1-(3-mercapto-2-méthylpropionyl)-L proline] capable de prévenir la formation de mélanine, exerçant son effet inhibiteur par chélation des ions cuivre au site actif tyrosinase. Une partie du processus d'inhibition est impliquée dans la réaction d'échange de disulfure entre le captopril et le domaine cystéine enrichi sur le site enzymatique actif [147].

Le métimazol (1-méthyl-2-mercaptoimidazole) est un médicament antithyroïdien qui inhibe l'activité de la tyrosinase du champignon de deux façons : par conjugaison avec les ou quinones, qui provoque une inhibition apparente dans la formation des produits pigmentés, et par chélation du cuivre au site actif de l'enzyme [147].

11. ENZYME ÉLASTASE

L'élastase, une enzyme sérine protéase [166] présente dans le jus pancréatique, catalyse l'hydrolyse de l'élastine [152], une protéine qui forme des fibres élastiques et aide à garder la peau souple mais rigide qui lui permet d'effectuer des activités normales telles que plier un muscle [166].

11.1. STRUCTURE DE L'ENZYME ÉLASTASE : SITE ACTIF

Le site actif (figure 25) est une fente dans laquelle le substrat est placé pour former le complexe enzyme-substrat, cette enzyme est une sérine protéase et a donc une structure conçue pour cliver les protéines (élastine expressément). L'élastase a un site actif avec trois acides aminés principaux : l'aspartate, l'histidine et la sérine qui constituent la triade catalytique créant ensemble une catalyse nucléophile, bien que les résidus volumineux de valine aident aussi à fermer la poche [166].

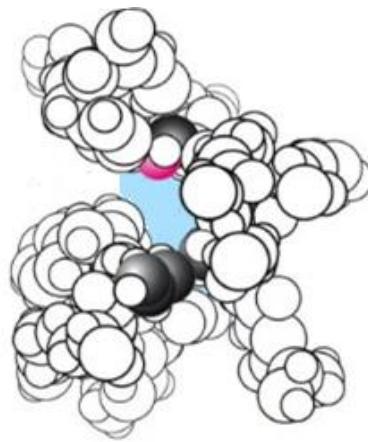


Figure 25. Site actif de l'enzyme élastase.

L'élastase reçoit ce nom parce qu'elle hydrolyse rapidement la protéine d'élastine, la protéine qui forme les fibres élastiques, l'un des principaux composants du tissu conjonctif [166], puisque les propriétés mécaniques des tissus sont dues en premier lieu à leur teneur en fibres d'élastine, qui confère l'élasticité, et en second lieu au collagène, qui confère la rigidité. Le poumon, les artères et la peau sont des organes élastiques, cette élasticité est due au grand nombre de faisceaux de fibres élastiques capables de se déformer et de revenir à la longueur basale. Le poumon, ayant beaucoup de fibres élastiques et peu de collagène, fonctionne comme un soufflet, se gonflant et se dégonflant avec le rythme respiratoire, tandis que dans la peau des personnes âgées et les baigneurs de soleil, il se plisse car il perd les fibres élastiques [168].

L'élastase est riche en Ala, Gly et Val et presque indigeste sinon. La poche union de l'élastase est largement occluse par les chaînes latérales des déchets Val et Thr, qui remplacent les déchets Gly, tapissant les poches de spécificité en quimitripsine et trypsine [169].

Le plasma humain contient une petite protéine appelée alpha-antitrypsine (AAT) qui a la propriété d'inhiber l'action enzymatique de plusieurs protéases importantes dont l'élastase. L'AAT est l'une des protéines "réactives en phase aiguë" dont la concentration plasmatique est élevée dans de nombreux états inflammatoires, cette protéine limite la destruction des fibres élastiques et paralyse les infections pulmonaires courantes provoquant fibrose pulmonaire et emphysème [168].

11.2. INHIBITEURS DE L'ENZYME ÉLASTASE

Des altérations de l'équilibre entre l'activité de l'élastase nucléophile humaine (HNE) et de ses inhibiteurs régulateurs ont été associées au développement d'un grand nombre de maladies affectant le système pulmonaire, telles que la maladie pulmonaire obstructive chronique, la mucoviscidose, syndrome de détresse respiratoire aiguë, atteinte pulmonaire aiguë, troubles inflammatoires (psoriasis, dermatite athérosclérose et polyarthrite rhumatoïde), de nombreux inhibiteurs peptidiques et non peptidiques ont été décrits, bien que seulement deux médicaments soient actuellement disponibles pour utilisation clinique : Prolastin® (médicament peptidique) et Silvestat Elaspol® 100 (un inhibiteur non peptidique sélectif de faible poids moléculaire). En plus de l'inhibiteur AZD9668 (Alvelestat) qui est en phase d'essais cliniques [170].

12. ENZYME LIPOXYGÉNASE

Les lipoxygénases (LOX) sont des enzymes métalloprotéiques appartenant au groupe des oxydoréductinases avec un fer non hémionique Fe (II) au site actif [159].

Ces enzymes catalysent la dioxigénation des acides gras polyinsaturés, donnant comme hydroxyperoxydes des acides gras [160] et peroxydent les acides gras avec des systèmes pentadiényle (1-cis, 4-cis) comme acide arachidonique, participant ainsi au processus de peroxydation lipidique. Ils sont activés par leur produit d'oxydation, c'est-à-dire lorsque Fe^{+2} (réducteur) s'oxyde en Fe^{+3} (oxydant), ayant comme substrat naturel l'acide arachidonique d'origine animale LOX et l'acide linoléique d'origine végétale LOX, dans le cas des lipoxygénases du soja, ils participent aux processus immunologiques, de régulation de croissance et de germination [159] catalysant les premières étapes de la voie métabolique de l'acide arachidonique impliquant une série de réactions chimiques dont les produits sont liés à l'inflammation, c'est pourquoi l'enzyme lipoxygénase (comme les cyclooxygénases) est une cible importante dans l'étude des médicaments anti-inflammatoires [162].

C'est pourquoi ces enzymes sont responsables de la catalyse de l'une des réactions les plus importantes comme l'hydroperoxydation des acides gras polyinsaturés ω -6, comme l'acide linoléique et l'acide linolénique dans les plantes et l'acide arachidonique dans les animaux (ou celui de leurs esters lipidiques correspondants), en un système hydroperoxyde, trans-butylène, qui doit être métabolisé par β -oxydation [159].

Bien que le LOX puisse également agir avec certains composés qui ont des doubles liaisons dans leur structure chimique, comme les pigments naturels pour le β -carotène et la chlorophylle [159].

Malgré leurs effets secondaires connus, les anti-inflammatoires demeurent le groupe thérapeutique le plus utilisé dans le monde pour le traitement des processus physiopathologiques. Son mécanisme d'action est lié à l'inhibition des enzymes qui font partie du métabolisme de l'acide arachidonique [163].

L'acide arachidonique (AA), substrat principal des lipoxygénases de mammifères, est un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone et quatre doubles liaisons en cis qui présente une grande flexibilité conformationnelle, cet acide est obtenu par l'alimentation et est estérifié dans des phospholipides membranaires et lorsque par un mécanisme quelconque les cellules sont endommagées, il est libéré dans le cytoplasme par action des phospholipases cellulaires, comme A2. Une fois libéré, il peut suivre deux voies métaboliques (figure 26), la voie de la cyclooxygénase, qui détermine la production de prostaglandines et de thromboxanes ou la voie de la lipoxygénase menant à la formation des leucotriènes et des hydroperoxydes. Ceux-ci ont un rôle très important dans les maladies inflammatoires et allergiques, médiatrices de la douleur, de la fièvre et de l'œdème [163].

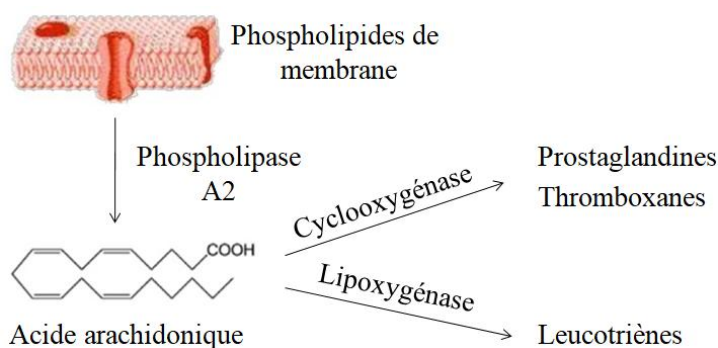


Figure 26. Simplification des voies métaboliques de l'acide arachidonique.

L'activité biologique des lipoxygénases chez les mammifères, y compris les lipoxygénases humaines, n'est pas entièrement connue, mais on a décrit que les lipoxygénases sont impliquées dans diverses maladies comme l'asthme, l'athérosclérose, Alzheimer, l'arthrite, le psoriasis et certains cancers (colorectal, prostate, sein et poumon). De plus, LOX est impliqué dans la réponse inflammatoire, puisque les produits de leur réaction entraînent la formation de leucotriènes, lipoxines, prostaglandines et thromboxanes [161].

Tout cela fait de la recherche d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes un axe de recherche intéressant, démontrant dans diverses études que les flavonoïdes et les isoflavonoïdes sont de bons inhibiteurs des lipoxygénases [161].

12.1. STRUCTURE DE L'ENZYME LIPOXYGÉNASE: SITE ACTIF

La structure de cette enzyme est une chaîne polypeptidique unique, avec un domaine N-terminal qui est orienté dans le quadrant supérieur gauche, présente une structure de baril- β , formée par les deux couches de feuilles anti-parallèles représentées sur la figure 27 par les flèches jaunes. Le domaine catalytique C-terminal correspond au reste de la structure représentée principalement par les hélices colorées en bleu, l'atome de fer catalytique en orange est situé au centre de ce domaine [164].

Le fer non hémique présent dans le site actif joue un rôle important dans la catalyse de la réaction, en passant de l'état d'oxydation Fe^{2+} à Fe^{3+} lorsque l'enzyme est active. Le métal est coordonné à l'intérieur du site actif par trois résidus de Sa, une molécule d'Ile, une molécule de H_2O , et un résidu qui varie entre Sa/Asn/Ser selon l'organisme dans lequel il se trouve [161].

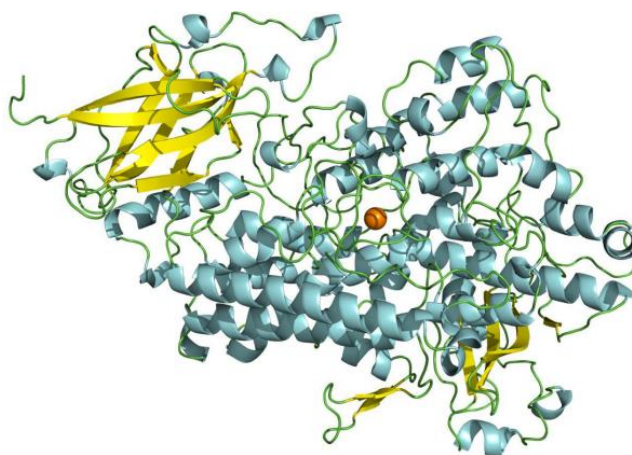


Figure 27. Structure de la lipoxygénase (LOX-1) de soja [164].

12.2. INHIBITEURS DE L'ENZYME LIPOXYGÉNASE

Les propriétés anti-inflammatoires du resvératrol sont définies par son effet antioxydant comme un inhibiteur des activités enzymatiques du COX et du LOX. Le resvératrol est une phytoalexine présente dans le raisin, le moût (principalement dans le vin rouge). Structurellement, le resvératrol est un polyphénol avec une structure de doubles liaisons qui existe en deux isoformes, cis- et trans-resvératrol, capable d'être oxydé, comme l'acide linoléique, par lipoxygénase [165].

Les autres inhibiteurs de l'enzyme lipoxygénase sont l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et le 3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), caractérisé par de bonnes sondes du site actif de LOX, pour ses propriétés chélatantes du Fe (III), plusieurs classes d'inhibiteurs de LOX ont également été décrites, comme les acides gras acétyléniques, les catéchols, les acides hydroxamiques, les phénols, les pyrazolines, les phénylhydrazones et les disulfures [159].

13. ANTIOXYDANTS

Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments de molécules dont un ou plusieurs électrons ont disparu dans leur orbite externe, ce qui les rend très réactifs, de sorte qu'ils sont capables de réagir avec des composés antioxydants par un processus caractérisé par la libération d'un atome d'hydrogène fourni par l'agent antioxydant [171].

Chez l'homme, les radicaux libres sont générés dans la chaîne respiratoire mitochondriale lorsque le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'ion ferreux Fe^{+2} , par l'action catalytique de la cyclooxygénase, dans la réaction de la vitamine C avec l'ion ferreux ou par l'action de la NADPH réductase [171].

D'autre part, les prooxydants sont des espèces très réactives de radicaux libres ou d'oxygène réactif présentes dans les systèmes biologiques ; ils proviennent d'une grande variété de sources [172, 173] et sont présents dans les systèmes alimentaires et biologiques. Dans les aliments, le processus d'auto-oxydation et de rancissement est causé par les radicaux libres en raison de la peroxydation des lipides et, dans les systèmes vivants, les radicaux libres attaquent les molécules biologiques clés, produisant de nombreuses maladies dégénératives [172, 174]. Un déséquilibre entre les prooxydants et les antioxydants dans l'organisme engendre le phénomène appelé stress oxydatif, qui est la clé du développement de maladies chroniques comme le cancer, l'artériosclérose, la polyarthrite rhumatoïde, certaines formes d'anémie et le diabète, entre autres [172, 175].

Les antioxydants sont des molécules qui agissent avant ou pendant une réaction en chaîne des radicaux libres (étape d'initiation, de propagation, de terminaison, de décomposition ou dans l'oxydation subséquente des produits) [172, 178] retardant ou empêchant l'oxydation d'autres molécules, puisque les radicaux libres sont susceptibles de réagir avec des composés oxydants [175], ceux-ci peuvent être classés en antioxydants synthétiques ou antioxydants naturels [171].

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les antioxydants naturels s'est considérablement accru, car ils offrent une plus grande sécurité que les composés synthétiques et sont donc mieux acceptés sur le plan commercial ; de plus, les agents phytochimiques sont plus efficaces que leurs équivalents synthétiques [172, 179].

Les antioxydants dérivés des plantes d'un point de vue phytochimique peuvent être des tanins, lignanes, stilbènes, coumarines, quinones, xanthones, acides phénoliques, flavones, flavones, flavonols, catéchines, anthocyanines et proanthocyanines qui grâce à leurs propriétés redox peuvent agir comme donneur d'hydrogène et également prévenir ou retarder le développement des maladies dégénératives[172, 180]. Pour cette raison, il est prévu de déterminer la valeur antioxydante de la collection de plantes dans la région de Doñana, étant donné l'importance de connaître de nouveaux agents aux propriétés antioxydantes et la facilité d'accès aux ressources naturelles elles-mêmes.

Les plantes comme sources d'antioxydants peuvent être utilisées pour la préservation de la valeur nutritionnelle en prévenant la détérioration oxydative des lipides et à des fins médicinales [181].

13.1 DPPH:2,2-DIPHENYLE-1-PICRYL HYDRAZYL

La méthode utilisée par le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil connu sous l'acronyme (DPPH), est l'une des plus utilisées pour mesurer la capacité antioxydante d'une espèce ou substance [171]. La molécule DPPH est connue pour être un radical libre stable en raison de la délocalisation d'un électron disparu sur toute la molécule, ce qui fait que la molécule ne se dimérise pas comme c'est le cas pour la plupart des radicaux libres, ce qui rend le radical libre DPPH a la capacité d'accepter un atome d'hydrogène [172].

Cette méthode développée par Brand-Williams et al. en 1995 [172], détermine les activités de capture des radicaux, en présence d'une substance antioxydante, mesurant le potentiel d'inactivation dudit radical dans un milieu aqueux [182], c'est-à-dire, elle est basée sur la stabilisation du radical qui est attribuée à la délocalisation de l'électron disparu qui donne une coloration violette [172].

Lorsque la solution de DPPH entre en contact avec une substance antioxydante pouvant donner un atome d'hydrogène ou avec une autre espèce radicale (R^*), la forme réduite DPPH-H ou DPPH-R est produite avec la perte de couleur correspondante et donc la perte d'absorbance, cette dernière étant mesurée spectrophotométriquement à 517 nm. Lorsque la dissolution de DPPH entre en contact avec une substance antioxydante pouvant donner un atome d'hydrogène ou avec une autre espèce radicale (R^*), la forme réduite DPPH-H ou DPPH-R est produite avec la perte de couleur correspondante et donc la perte d'absorbance [183], mesurée par spectrophotométrie à 517 nm, le pourcentage de DPPH absorbé par les radicaux libres déterminé par différence d'absorbance [184].

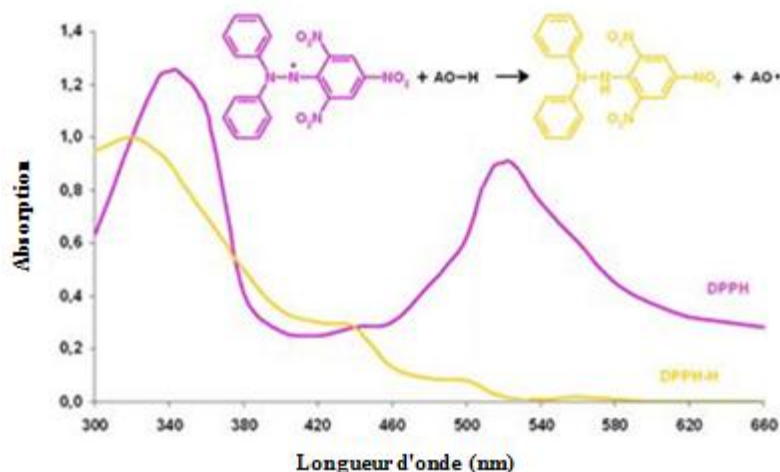


Figure 28. Graphique de changement de couleur du DPPH du violet au jaune lorsqu'il est exposé à une substance oxydante [modifié 185].

Par conséquent, la disparition de DPPH- fournit un indice pour estimer la capacité du composé d'essai à piéger les radicaux [181], et cette méthode a un temps de réaction de 20 à 30 minutes au lieu du temps de réaction total de 120 minutes nécessaire pour atteindre un état stable et compléter la réaction redox [172, 186].

Les résultats de la DPPH ont généralement été exprimés sous forme de valeur de concentration maximale de la moyenne inhibitrice (IC_{50}), définie comme la quantité d'antioxydants nécessaires pour diminuer la concentration initiale de DPPH à 50 %, dont la valeur est obtenue en représentant le pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration de l'extrait [172].

13.2. POLYPHÉNOLS ET FAVONOÏDES

Les polyphénols et les flavonoïdes sont des constituants très appréciés des plantes, car ils ont un grand nombre de groupes hydroxyles dans leur structure [172, 187] ce qui favorise la capture et la séquestration des radicaux libres [181, 188], c'est pour eux que la majeure partie du pouvoir antioxydant des plantes est due à ces composés [181]. De même, un grand nombre d'études ont établi que les composés phénoliques des plantes, y compris les flavonoïdes, sont de puissants antioxydants aux effets antimutagènes et anticancérigènes [181].

L'activité antioxydante des polyphénols est la propriété la plus intéressante, puisque leur structure chimique contient un nombre variable de groupes hydroxyles phénoliques, qui réagissent avec les radicaux libres [181].

D'autre part, les flavonoïdes sont des polyphénols qui ont au moins deux de leurs unités phénoliques, étant largement distribués dans les plantes et parmi eux on trouve des flavones, flavonols, isoflavones, flavonoles, flavonoles, catéchines, flavonones [172, 189].

Pour déterminer la teneur en polyphénols d'une plante ou d'une matrice végétale, on utilise la méthode du réactif Folin-Ciocalteu (F-C), qui utilise un mécanisme de réaction d'oxydation/réduction. Ce test mesure la capacité de réduire le réactif phosphomolybdique/acide phosphomolybdique/phosphotungstique en un complexe bleu qui est contrôlé spectrophotométriquement, où le molybdène est réduit dans le complexe, produisant une réaction de transfert électronique entre le Mo(VI) et le réducteur, qui est, le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, par oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), la couleur bleue produite étant proportionnelle à la concentration des composés phénoliques présents dans les échantillons, ayant une absorption maximale à 765 nm [172, 181, 190].

Ce test est couramment utilisé à la fois pour sa simplicité et pour la disponibilité commerciale du réactif car il s'agit d'une procédure normalisée puisque les polyphénols sont facilement oxydables dans un milieu basique par le réactif F-C [172].

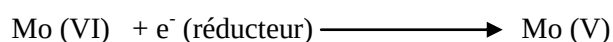


Figure 29. Réaction de transfert d'électrons avec le réactif Folin-Ciocalteu [172, 190].

De nos jours, on s'intéresse de plus en plus aux flavonoïdes, car leur grande importance dans l'alimentation humaine a été mise en évidence par la grande variété d'activités biologiques qu'ils présentent, dont l'inhibition des enzymes hydrolytiques et oxydatives (phospholipase A2, cyclooxygénase, lipoxygénase), leurs effets antibactériens, leur activité anti-inflammatoire et antioxydante. Comme ils agissent comme antioxydants, ils aident à contrer ou à diminuer le risque de cancer, de maladie cardiovasculaire ou de stress oxydatif [172, 191, 192].



CAPÍTULO II

MATERIALES Y REACTIVOS

1. **MATERIALES Y REACTIVOS**

1.1. REACTIVOS

- Acetonitrilo 99.8% HPLC gradiente grade (Prolabo).
- Acetato de etilo 99.8% (Sigma Aldrich Co. LLC, ref.270989).
- Ácido fórmico 98-100% GR para análisis (Merck).
- Agua destilada calidad Alpha Q. (M.A., EE. UU.).
- n-Hexano 95% (Sigma Aldrich Co. LLC, ref. 296090).
- Etanol 99.8% (Sigma Aldrich Co. LLC, ref. 51976).
- Carbamazepina, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacin, diclofenaco e ibuprofeno con una pureza mayor al 99% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Acetonitrilo de calidad cromatográfica LC-MS (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Agua de calidad cromatográfica LC-MS (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Ácido fórmico (Suprapur[®] Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Metanol y ACN de calidad cromatográfica HPLC (VWR, Barcelona, España).
- Enzima tirosinasa de champiñón (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. T3824-50 KU).
- Enzima elastasa de páncreas de cerdo (Merck 324682-1000U).
- Enzima lipoxigenasa de semilla de soja (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. L7395-15MU).
- Enzima colagenasa de la bacteria *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. C0773).
- Quercetina (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. 33, 7895-1).
- Ácido kójico (Alfa Aesar, ref. A10760).
- L-Tirosina (Fluka, ref. 93830).
- L-DOPA 98% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. D9628).

- Ácido linoleico (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. L7395-15MU).
- N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) (Bachem, ref. 4000902).
- Ácido tánico (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. 403040).
- FA-Leu-Gly-Pro-Ala-OH (FALGPA) (Bachem ref. 4006713).
- CaCl₂ 99% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. 208291).
- NaCl 99.5% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. S7653).
- Tricina 99% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. T0377).
- Ácido gálico 97.5% (Sigma Aldrich Co. LLC, ref. G7384).
- Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co. LLC, ref. 47641).
- Na₂CO₃ (Sigma Aldrich Co. LLC, ref 1613757)
- DPPH (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. D913-2).
- Trolox 97% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. 238813).
- AlCl₃ 99.9% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. 563919).
- CH₃COOK 99% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. P1190).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.7% (Sigma-Aldrich Co. LLC, ref. D2650).

1.2. MATERIAL

- Baño de ultrasonidos con termostato. Ultrasons (Selecta).
- Baño de ultrasonidos (Ultrasoniccleaner) (VWR, Barcelona, España).
- Bomba de vacío (Millipore).
- Agitador magnético calefactor marca SBS, modelo AC5-06, suministrado por Instrumentación Científica SBS, S.L. (Barcelona).
- Liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5.

- Microondas Milestone® modelo Ethos 900 con capacidad para seis reactores, sistema de seguridad de aspiración de gases y un sistema de control con un procesador para la selección de los tiempos de radiación, potencia, ventilación y enfriamiento.
- Equipo de purificación de agua Milli-Q (M.A. EE. UU.).
- Centrífuga Hettich Universal 320 (Tipo 1401).
- Savant Sped Vac Plus SC110A (Analytical Instruents Brokers LLC, Minneapolis, Minnesota, EE. UU.).
- Evaporador, Genevac™ miVac Duo concentrator, modelo: DUC-23050-B00.
- Digestor y destilador Kjeldahl: J.P. Selecta. N° 4001538.
- Robot automatizado para el manejo de líquidos epMotion®5070 de eppendorf con software epBlue™ (Montesson, France)
- Ultracongelador (-80°C) (Ing. Climas, modelo 330/86).
- Jeringas estériles de polipropileno de 1 mL (Acofarma).
- Microfiltros de 0.2 µm de PTFE 13 mm (VWR International).
- Material volumétrico diverso: matraces aforados, pipetas, vasos de precipitado viales de inyección y viales de almacenamiento.
- Micropipetas graduadas de 1-10 µL, 1-100 µL, 100-1000 µL.
- Papel de filtro Albert (20-25 µm de tamaño de poro).
- Pipetas Pasteur.
- Sistema de evaporación por corriente de nitrógeno.
- Tubos de centrífuga de 50 mL.
- Placas 96 pocillos Nunc 96 E. Untreated y Costar UV transparent.
- Tubos eppendorf 1.5 mL, 2 mL, 5 mL.
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL.
- Puntas de pipetas eppendorf.
- Películas adhesivas (Greiner Bio-One; Courtaboeuf, Île-de-France, Francia).

- Placas 96 pocillos Termo Nunc y Costar (Villebon-su-Yvette, Île-de-France, Francia).

Todo el material volumétrico no desechable empleado fue sumergido durante un mínimo de 24 horas en mezcla oxidante y lavado convenientemente con agua antes de su utilización.

1.3. INSTRUMENTACIÓN

- Balanzas analíticas 0.1 mg de precisión (Sartorius, Mettler AJ100 y AdventurerTM Pro (Dhaus).
- Balanza electrónica Mettler AJ100.
- Balanza analítica de precisión AdventurerTM Pro (Dhaus).
- Cromatógrafo líquido Acquity UPLC Ultimate acoplado a un detector cuadrupolo-tiempo de vuelo XEVO G2-S QTOF LC/MS (WatersCoorporation, Manchester, Reino Unido). Está compuesto por módulo microdesgasificador, compartimento de columna termostatzado, automuestreador termostatzado y fuente de ionización dual electrospray e ionización química (ESI/ESCI).
- Cromatógrafo Agilent 1200 HPLC (Courtabouef, Île-de-France, Francia), equipado con detectores de fila de diodos (DAD) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD).
- Columnas cromatográficas:
 - ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm).
 - ZORBAX Eclipse XDB-C18 Solvent Saver Plus (3.0 x 100 mm 3.5 µm).
 - Agilent Eclipse XDB-C18 (3.0 x 150 mm 3.5 µm).
 - Phenomenex, Luna ® C18 (150 x 4.6 mm id, 5 µm).
 - ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 x 4.6 mm id, 1.7 µm).
 - Phenomenex, Luna ® C18 (150 x 0.3 mm id, 3 µm).
- Precolumna: ACQUITY® BEH C18 Vanguard (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido).
- Espectrofotómetro: Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Wokingham, Berkshire, Reino Unido).

2. DISOLUCIONES

2.1. DISOLUCIONES PATRÓN

Se prepararon disoluciones patrón madre metanólicas a una concentración de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de todos los principios activos estudiados (ENR, FMQ, DCL, IBU, CBZ) excepto de CPR que debido a su baja solubilidad a concentraciones elevadas, se preparó a una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ diluyendo 2.5 mg de compuesto en 5 mL de agua MilliQ, enrasando en un volumen final de 25 mL de metanol. Las disoluciones madre se conservaron en frío a 4°C , salvo la CPR, que se conservó en un lugar seco a temperatura ambiente al precipitar a baja temperatura por su solubilidad. Todas las disoluciones madre mostraron una estabilidad en el tiempo de al menos un mes.

2.2. DISOLUCIONES PARA TESTS ENZIMÁTICOS

2.2.1. DISOLUCIONES TEST ENZIMÁTICO: ENZIMA COLAGENASA

Para realizar el test enzimático con enzima colagenasa, fue necesario preparar disolución de tampón tricina, disoluciones de sustrato, enzima e inhibidores de referencia.

- Disolución tampón tricina pH 7.5:

Se prepararon previamente 200 mL de disolución de tricina a una concentración de 50 mM, 200 mL de una disolución de NaCl con una concentración de 400 mM y 200 mL de una disolución de CaCl_2 a 10 mM, una vez mezcladas las disoluciones se ajustó el pH a 7.5 con una disolución de NaOH 1 M.

- Disolución enzima colagenasa:

A una solución stock comercial de enzima colagenasa a $15 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$ se añadieron 500 μL de agua Milli-Q, se homogeneizó la disolución mediante agitación en vortex y se tomaron alícuotas de 28.5 μL en tubos eppendorf de 1 mL que fueron liofilizadas durante 2 horas. El residuo resultante se disolvió en 16.3 mL de disolución tampón tricina pH 7.5, obteniendo una concentración de $53 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- Disolución sustrato:

Se preparó una disolución 5.15 mM del sustrato N-[3-(2-furil) acrililo]-L-leucil-glicil-L-prolilo-L-alanina, (FALGPA) en una disolución tampón de tricina de pH 7.5.

- Disolución estándar inhibidora:

Como inhibidor estándar de la enzima colagenasa se utilizó una disolución de ácido tánico 1.72 μM en 1 mL de DMSO.

Se empleó como inhibidor cosmético, un extracto de la planta regaliz de concentración 3.433 mM en DMSO, preparado previamente por el grupo de Metabolismo y valoración de la biodiversidad vegetal, del Instituto de Química de Niza.

2.2.2. DISOLUCIONES TEST ENZIMÁTICO: ENZIMA TIROSINASA

Para llevar a cabo test enzimático con la enzima tirosinasa, es necesario preparar la disolución tampón en la que va ir disuelta tanto la enzima como el sustrato, así como la disolución de la enzima tirosinasa, los dos sustratos empleados en dicho test enzimático y el inhibidor utilizado.

- Disolución tampón fosfato pH 6.8:

Se preparó una disolución tampón fosfato a pH 6.8 mezclando 122 mL de una disolución de Na_2HPO_4 a 0.17 M, 127 mL de disolución de NaH_2PO_4 a 0.24 M y 250 mL de agua MilliQ.

- Disolución enzima tirosinasa:

Se añaden 971 μL de agua MilliQ, al stock comercial de enzima tirosinasa de champiñón, ($2687 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$), distribuyéndose en alícuotas de 50 μL de dicha disolución enzimática en tubos eppendorf de 1 mL obteniendo una concentración final de $2574.9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para realizar el test enzimático con el sustrato L-Tirosina, se disolvió cada alícuota en 15 mL de tampón fosfato pH 6.8, teniendo una concentración de enzima tirosinasa de $171.66 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo para el sustrato L-DOPA, se preparó una disolución de enzima tirosina a una concentración de $85.83 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ en 30 mL de tampón fosfato pH 6.8.

- Disoluciones del sustrato:

Tanto para el sustrato L-Tirosina como para el sustrato L-DOPA se preparó una disolución 1 mM de cada sustrato en una disolución tampón fosfato a pH 6.8.

- Disolución estándar inhibidora:

Se preparó una disolución de ácido kójico (inhibidor estándar de la enzima tirosinasa descrito en bibliografía) 3.43 mM en DMSO, como inhibidor cosmético se utilizó el extracto de la planta regaliz de concentración 3.433 mM.

2.2.3. DISOLUCIONES TEST ENZIMÁTICO: ENZIMA ELASTASA

Del mismo modo que en el ensayo enzimático para la enzima tirosinasa, fue necesario preparar las siguientes disoluciones:

- Disolución Tampón tris pH 8:

Se disolvieron 4.44 g de hidrocloreuro de trizma y 2.65 g de trizma base en 1 L de agua milliQ.

- Disolución enzima elastasa:

De la enzima elastasa pancreática de cerdo a $7.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ se preparó una disolución de $0.171 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, en 15 mL de tampón tris de pH 8.

- Disoluciones del sustrato:

Se empleó como sustrato Succinil-alanil-alanil-alanina p-nitroanilida (Suc-A-A-A-pNA), un inhibidor de las enzimas proteasas. Se preparó una disolución 2.06 mM en tampón tris de pH 8, para ello, se enfrió el sustrato SucAAAPnA, y a continuación se añadió gota a gota el tampón tris, ya que esta reacción es muy exotérmica.

- Disolución estándar inhibidora:

Se preparó una disolución $8583.33 \text{ } \mu\text{M}$ de quercetina en DMSO como inhibidor estándar y se utilizó como inhibidor cosmético un extracto de frambuesa Hydra Berry de concentración $3.433 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ elaborado por el grupo de Metabolismo y valoración de la biodiversidad vegetal.

2.2.4. DISOLUCIONES TEST ENZIMÁTICO: ENZIMA LIPOXIGENASA

Para realizar el test enzimático de la enzima lipoxigenasa se prepararon previamente las siguientes disoluciones:

- Disolución Tampón fosfato pH 8:

A 500 mL de una disolución de Na_2HPO_4 0.1 M se añadieron gota a gota 30 mL de una solución de NaH_2PO_4 0.1 M, diluyéndolo con 500 mL de agua Milli-Q.

- Disolución enzima lipoxigenasa:

La disolución madre comercial de enzima lipoxigenasa de semilla de soja de concentración $341599 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, se diluyó convenientemente en tampón fosfato pH 8 para obtener una concentración final de $686.66 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- Disolución del sustrato:

Se tomaron alícuotas de 55 μL de ácido linolénico de la disolución comercial de 1g, dejándolas en contacto con el aire durante 30 minutos antes de su uso, para favorecer la oxidación. A 5 μL de las alícuotas, se le añadieron 10 μL de etanol y 20 mL de disolución tampón fosfato de pH 8, a continuación se agitó enérgicamente en el vortex hasta que la mezcla adquirió aspecto de mousse.

- Disolución estándar inhibidora:

El inhibidor estándar empleado fue una disolución 1000 μM de quercetina en DMSO, mientras que el inhibidor cosmético fue una disolución de resveratrol de $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3. DISOLUCIONES TEST ANTIOXIDANTES

2.3.1. FLAVONOIDES

Para la realización del test de antioxidantes de flavonoides, se prepararon: una disolución de AlCl_3 de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, (0.75 M) y una disolución acuosa de acetato de potasio 1 M y disoluciones diluidas de quercetina hidratada en DMSO, por dilución de un patrón comercial, de concentraciones comprendidas entre $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3.2. POLIFENOLES

Se prepararon disoluciones de ácido gálico entre $4000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por dilución de un patrón comercial, obteniéndose concentraciones finales en el pocillo de ensayo de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Una disolución diluida Folin-Coicalteu/ H_2O (1:1 v/v) y una disolución acuosa de Na_2CO_3 a 0.70 M.

2.3.3. DPPH

Se preparó una disolución de tampón acetato de pH 5.4 a partir de una disolución de NaOAc de concentración de 0.1 M y una disolución a 0.1 M de AcOH.

En ausencia de luz se preparó una disolución acuosa 0.4 M de DPPH, que fue conservada entre 2-4°C durante el tiempo de análisis.



CHAPITRE II

MATERIELS ET RÉACTIFS

1. MATERIELS ET RÉACTIFS

1.1 RÉACTIFS

- Acetonitrile 99.8 % HPLC gradient grade (Prolabo).
- Acétate d'éthyle 99.8 % (Sigma Aldrich Co. LLC, réf.270989).
- Acide formique 98-100 % GR pour analyse (Merck).
- Eau distillée de qualité Alpha Q (M.A., U.S.A.).
- n-Hexane 95 % (Sigma Aldrich Co. LLC, réf. 296090).
- Éthanol 99.8 % (Sigma Aldrich Co. LLC, réf. 51976).
- Carbamazépine, fluméquine, ciprofloxacine, enrofloxacin, diclofénac et ibuprofène de pureté supérieure à 99 % (Sigma Aldrich Co. LLC).
- Acétonitrile LC-MS qualité chromatographique (Sigma Aldrich Co. LLC).
- Eau de qualité chromatographique LC-MS (Sigma Aldrich Co. LLC).
- Acide formique (Suprapur® Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne).
- Méthanol de qualité chromatographique HPLC et ACN (VWR, Barcelone, Espagne).
- Enzyme tyrosinase de champignon (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. T3824-50KU).
- Enzyme élastase du pancréas de porc (Merck 324682-1000U).
- Enzyme lipoxigénase de graines de soja (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. L7395-15MU).
- Enzyme collagenase de la bactérie *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. C0773).
- Quercétine (Sigma-Aldrich Co LLC, réf. 33, 7895-1).
- Acide kojique (Alpha Aesar, réf.A10760).
- L-Tyrosine (Fluka Réf. 93830).
- L-DOPA (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. D9628).
- Acide linoléique (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. L7395-15MU).

- N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) (Bachem réf. 4000902).
- Acide tannique (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. 403040).
- FA-Leu-Gly-Pro-Ala-Pro-Ala-OH (FALGPA) (Bachem réf. 4006713).
- CaCl_2 99 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. 208291).
- NaCl 99.5 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. S7653).
- Tricina 99 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. T0377).
- Acide gallique 97.5 % (Sigma Aldrich Co. LLC, réf. G7384).
- Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co. LLC, réf. 47641).
- Na_2CO_3 (Sigma Aldrich Co. LLC, réf 1613757).
- DPPH (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. D913-2).
- Trolox (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf.238813).
- AlCl_3 99.9 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. 563919).
- CH_3COOOK 99 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. P1190).
- DMSO 99.7 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, réf. D2650).

1.2. MATÉRIEL

- Bain à ultrasons avec thermostat. Ultrasons (Selecta).
- Bain à ultrasons (VWR, Barcelone, Espagne).
- Pompe à vide (Millipore).
- Agitateur magnétique de marque SBS, modèle AC 5-06, fourni par Instrumentación Científica SBS, S.L. (Barcelone).
- Lyophilisateur de table (Hucoa-Erlöss, Espagne).
- Lyophilisateur LABCONCO Free Zone 2.5.

- Milestone® Microwave modèle Ethos 900 avec une capacité de six réacteurs, un système de sécurité pour l'aspiration des gaz et un système de contrôle avec processeur pour la sélection des temps de radiation, de puissance, de ventilation et de refroidissement.
- Équipement de purification d'eau Milli-Q (MA, USA).
- Centrifugeuse universelle Hettich 320 (type 1401).
- Savant Sped Vac Plus SC110A (Analytical Instruents Brokers LLC, Minneapolis, Minnesota, USA).
- Évaporateur, Genevac TM miVac Duo concentrateur, modèle : DUC-23050-B00.
- Digesteur et distillateur Kjeldahl : J.P. Selecta. NO. 4001538.
- Robot de manipulation automatique de liquides epMotion® 5070 d'eppendorf avec logiciel epBlue™ (Montesson, France).
- Congélateur (-80°C) (Ing. Climas, modèle 330/86).
- 1 mL de seringues stériles en polypropylène (Acofarma).
- Microfiltres de 0.2 µm de PTFE 13 mm (VWR International).
- Divers équipements volumétriques: fioles jaugées, pipettes, béchers pour précipitation, flacons d'injection et flacons de stockage.
- Micropipettes graduées de 1-10 µL, 1-100 µL, 100-1000 µL.
- Papier filtre Albert (taille des pores 20-25 µm).
- Pipettes Pasteur.
- Système d'évaporation par flux d'azote.
- Tubes à centrifuger de 50 mL.
- Ultra congélateur à -80°C (Ing. Climas, 330/86).
- Plaques 96 puits Nunc 96 E. Non traitées et transparentes aux UV Costar.
- Tubes eppendorf 1.5 mL, 2 mL, 5 mL.
- Tubes Falcon de 15 mL et 50 mL.
- Pointes de pipette eppendorf.

Tous les matériaux volumétriques non jetables utilisés ont été immergés pendant au moins 24 heures dans un mélange oxydant et lavés à l'eau avant utilisation.

1.3. INSTRUMENTATION

- Balances analytiques 0.1 mg de précision (Sartorius, Mettler AJ100 et Adventurer TM Pro (Dhaus).
- Balance électronique Mettler AJ100.
- Balance d'analyse de précision Adventurer TM Pro (Dhaus).
- Acquity UPLC Ultimate chromatographe en phase liquide couplé à un détecteur de temps de vol quadripolaire XEVO G2-S QTOF LC/MS (Waters Corporation, Manchester, Royaume-Uni). Il est composé d'un module de micro dégazage, d'un compartiment à colonne thermostatée, d'un échantillonneur automatique thermostaté et d'un électrospray à double source d'ionisation et ionisation chimique (ESI/ESCI).
- Chromatographe Agilent 1200 HPLC (Courtabouef, Île-de-France, Francia), équipé de détecteurs à rangées de diodes (DAD) et diffusion de lumière (ELSD).
- Colonnes chromatographiques :
 - ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm.).
 - ZORBAX Eclipse XDB-C18 Solvent Saver Plus (3.0 x 100 mm, 3.5 µm.).
 - Agilent Eclipse XDB-C18 (3.0 x 150 mm, 3.5 µm).
 - Phenomenex, Luna ® C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm).
 - Phenomenex, Luna ® C18 (150 x 0.3 mm, 3 µm).
- Précolonne: ACQUITY® BEH C18 Vanguard (Waters Corporation, Manchester, Royaume-Uni).
- Spectrophotomètre. Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Wokingham, Berkshire, Royaume-Uni).

2. DISSOLUTIONS

2.1. SOLUTIONS ÉTALONS

Des solutions étalons à base de méthanol ont été préparées à une concentration de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour tous les principes actifs étudiés (ENR, FMQ, DCL, IBU, CBZ) sauf pour la CPR qui, en raison de sa faible solubilité aux concentrations élevées, a été préparée à une concentration de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ par dilution de 2.5 mg du composé dans 5 mL d'eau MilliQ, soit 25 mL du méthanol dans un volume final. Les solutions mères ont été conservées au froid à 4°C , à l'exception du CPR, qui a été conservé dans un endroit sec à température ambiante en raison de la précipitation à basse température en raison de sa solubilité. Toutes les solutions mères ont montré une stabilité dans le temps d'au moins un mois.

2.2. SOLUTIONS POUR LES TESTS ENZYMATIQUES

2.2.1. SOLUTIONS DE TEST ENZYMATIQUE: ENZYME COLLAGÉNASE

Pour effectuer le test enzymatique de l'enzyme collagénase, il était nécessaire de préparer une solution tampon de tricine, des solutions de substrat, d'enzyme et des inhibiteurs de référence.

- Solution tampon de tricine pH 7.5:

On a préalablement préparé 200 mL de solution de tricine à une concentration de 50 mM, 200 mL d'une solution de NaCl à une concentration de 400 mM et 200 mL d'une solution de CaCl_2 à 10 mM, après avoir mélangé les solutions le pH a été ajusté à 7.5 avec une solution de NaOH 1 M.

- Solution enzymatique de collagénase:

500 μL d'eau Milli-Q a été ajoutée à une solution commerciale d'enzyme collagénase à $15 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, après la solution a été homogénéisée par agitation vortex et des aliquotes de 28.5 μL ont été prises dans des tubes eppendorf de 1 mL qui ont ensuite été lyophilisés dans un lyophilisateur speedvac pendant 2 heures afin d'éliminer le contenu en eau. Le résidu ainsi obtenu a été dissous dans 16.3 mL de solution tampon tricine pH 7.5, pour obtenir une concentration de $53 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- Dissolution du substrat:

Une dissolution à 5.15 mM du substrat N-[3-(2-furil) acrylique]-L-leucil-glicil-L-prolyl-L-alanine (FALGPA) a été préparée dans une solution tampon tricine à pH 7.5.

- Solution étalon inhibitrice:

Comme inhibiteur de l'enzyme collagénase, on a utilisé de l'acide tannique, on a donc préparé une solution de 1.72 μM dans 1 mL de DMSO de cet acid, comme inhibiteur cosmétique a été utilisé, un extrait de la plante de réglisse de concentration 3.433 mM en DMSO, préalablement préparé par le groupe de Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale, de l'Institut de Chimie de Nice.

2.2.2. SOLUTIONS DE TEST ENZYMATIQUE: ENZYME TYROSINASE

Pour effectuer un test enzymatique avec l'enzyme tyrosinase, il est nécessaire de préparer la solution tampon dans laquelle l'enzyme et le substrat seront dissous, ainsi que la solution enzymatique tyrosinase, les deux substrats utilisés dans le test enzymatique et l'inhibiteur utilisé.

- Solution tampon de phosphate pH 6.8:

Une solution tampon de phosphate a été préparée à pH 6.8 en mélangeant 122 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 0.17 M; 127 mL d'une solution de NaH_2PO_4 à 0.24 M et 250 mL d'eau MilliQ.

- Tyrosinase enzyme solution:

Ajouter 971 μL d'eau MilliQ au stock commercial d'enzyme tyrosinase de champignon ($2687 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$), distribuer 50 μL de cette solution enzymatique dans eppendorf de 1 mL pour obtenir une concentration finale de $2574.9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Pour effectuer cet essai enzymatique avec le substrat de L-Tyrosine, chaque aliquote a été dissoute dans 15 mL de tampon phosphate pH 6.8, ayant une concentration en enzyme tyrosinase de $171.66 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cependant, pour le substrat L-DOPA, une solution enzymatique de tyrosine a été préparée à une concentration de $85.83 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans 30 mL de tampon phosphate pH 6.8.

- Dissolutions de substrats:

Pour le substrat L-Tyrosine et le substrat L-DOPA, une solution à 1 mM de chaque substrat a été préparée dans une solution tampon phosphate à pH 6.8.

- Solution étalon inhibitrice:

Une solution d'acide kojique a été préparée (inhibiteur de l'enzyme tyrosinase décrit dans la bibliographie) à 3.43 mM en DMSO et l'extrait de la plante de réglisse de concentration 3.433 mM a été utilisé en tant qu'inhibiteur cosmétique.

2.2.3. SOLUTIONS DE TEST ENZYMATIQUE: ENZYME ÉLASTASE

Comme dans le dosage enzymatique de l'enzyme tyrosinase, les dilutions suivantes ont dû être préparées:

- Solution tampon Tris pH 8:

4.44 g de chlorhydrate de trizma et 2.65 g de base de trizma ont été dissous dans 1 L d'eau milliQ.

- Solution enzymatique d'élastase:

Une solution de $0.171 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ a été préparée à partir de l'enzyme élastase pancréatique du porc à $7.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, dans 15 mL de tampon pH 8 tris.

- Dissolutions de substrats:

Le succinyl-alanyl-alanyl-alanine p-nitroanilide (Suc-A-A-A-PNA), un inhibiteur de protéase, a été utilisé comme substrat. Une solution de 2.06 mM a été préparée dans un tampon de pH 8 tris, pour lequel le substrat SucAAAPnA a été refroidi, puis le tampon tris a été ajouté goutte à goutte, car cette réaction est très exothermique.

- Solution étalon inhibitrice:

Une solution de quercétine à $8583.33 \text{ } \mu\text{M}$ a été préparée dans le DMSO comme inhibiteur standard et un extrait de framboise Hydra Berry à une concentration de $3.433 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a été utilisé comme inhibiteur cosmétique, élaboré par le groupe Métabolome et valorisation de la biodiversité végétale.

2.2.4. SOLUTIONS D'ESSAI ENZYMATIQUE: ENZYME LIPOXYGÉNASE

Pour le test enzymatique de l'enzyme lipoxigénase, les solutions suivantes ont été préparées au préalable:

- Solution tampon de phosphate pH 8:

500 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 0.1 M Na_2HPO_4 , 30 mL d'une solution de NaH_2PO_4 à 0.1 M ont été ajoutés goutte à goutte, dilués dans 500 mL d'eau Milli-Q.

- Solution enzymatique de lipoxygénase:

La solution de lipoxygénase d'enzyme mère commerciale de la concentration de graines de soja 341599 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, a été facilement diluée dans un tampon phosphate pH 8 pour obtenir une concentration finale de 686.66 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- Dissolution du substrat:

Des aliquotes de 55 μL d'acide linoléique ont été prélevées dans la solution commerciale de 1 g, les laissant en contact avec l'air pendant 30 minutes avant utilisation, pour favoriser l'oxydation. A 5 μL des aliquotes, 10 μL d'éthanol et 20 mL de solution tampon phosphate pH 8 ont été ajoutés, puis agités vigoureusement dans le vortex jusqu'à ce que le mélange prenne l'aspect de mousse.

- Solution étalon inhibitrice:

L'inhibiteur standard utilisé était une solution de 1000 μM de quercétine dans le DMSO, tandis que l'inhibiteur cosmétique était une solution de resvératrol à 3.433 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3. SOLUTIONS DES TESTS ANTIOXYDANTS

2.3.1. FLAVONOÏDES

Pour l'exécution de l'essai sur les flavonoïdes antioxydants, les éléments suivants ont été préparés: une solution d' AlCl_3 de 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (0.75 M) et une solution aqueuse de CH_3COOK 1 M et des solutions diluées de quercétine hydratée en DMSO de concentrations entre 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ par dilution d'un stock commercial.

2.3.2. POLYPHÉNOLS

Les solutions d'acide gallique ont été préparées par dilution d'un étalon commercial entre 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtenant des concentrations finales dans le puits d'essai de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Solution diluée de Folin-Coicalteu/ H_2O (1:1 v/v) et une dissolution accusatoire de Na_2CO_3 à 0.7 M.

2.3.3 DPPH

Une solution tampon d'acétate de pH 5.4 a été préparée à partir d'une solution de NaOAc ayant une concentration de 0.1 M et d'une solution d'AcOH 0.1 M.

Dissolution du radical DPPH, en l'absence de lumière, une dilution de 0.4 M de DPPH a été effectuée, qui a été conservée entre 2-4°C pendant la durée de l'analyse.



CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se aborda, en primer lugar, la optimización, desarrollo y validación de un método analítico empleando cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas cuadrupolo/tiempo de vuelo (UPLC-QTOF-MS) para la identificación y cuantificación de seis principios activos farmacológicos en las matrices vegetales *Lavandula dentata*, (hoja, tallo y raíz) *Salicornia europaea* (tallo y raíz) y *Juncus sp.* (tallo y raíz). Posteriormente, se propone una modificación del procedimiento para la identificación de metabolitos relacionados con los citados principios activos.

Asimismo, se exponen con detalle los distintos ensayos de exposición a los que han sido sometidas las matrices vegetales, evaluando la absorción de esos compuestos en cada una de las especies vegetales, así como la aparición de posible metabolitos de los compuestos suministrados.

Finalmente, se describe el tratamiento de extracción al que ha sido sometida la colección de 150 plantas del entorno del Parque Nacional de Doñana, y la optimización en los distintos tests enzimáticos y antioxidantes para la posterior identificación de las fracciones positivas, si procediese.

1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se pretende obtener una separación cromatográfica adecuada de los seis principios activos farmacológicos seleccionados en un tiempo razonable, por lo que se consideraron varios aspectos para su optimización: la elección de la columna cromatográfica, la optimización de los parámetros relacionados con la sensibilidad y selectividad y las condiciones de detección.

1.1.1. ELECCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Considerando la bibliografía existente aplicable, se probaron diversos tipos de columnas cromatográficas. En casi todos los trabajos que implican la separación de analitos con características idénticas o similares a las de los compuestos analizados en esta Tesis, se emplean columnas en fase reversa, con fase estacionaria de C18 apolar, de forma que los principios activos se eluirán de más polares a menos polares.

Inicialmente se eligió una columna ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm), por su alto poder de resolución empleando un sistema cromatográfico de UPLC. A pesar de obtener inicialmente una buena separación cromatográfica, la columna presentó problemas de oclusión y deterioro cuando se inyectaron las muestras reales, produciéndose sobrepresiones no asumibles. Se procedió, entonces, a emplear una columna ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2.1 x 12.5 mm, 5 µm) con una fase estacionaria menos hidrofóbica, aumentando también el tamaño de partícula y la longitud de la columna para conseguir una mejor separación. En este caso los resultados en lo que respecta a la resolución de picos no fueron del todo satisfactorios. Por último, se ensayó una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (3.0 x 150 mm, 3.5 µm), que permitió una buena resolución y separación de los picos en un tiempo razonable, eluyéndose el último compuesto a un tiempo de 7 minutos aproximadamente, y completándose el desarrollo cromatográfico en 12 minutos en modo positivo y 10 minutos en modo negativo. En el caso de la separación para detección por MS^e-TOF, el procedimiento cromatográfico se alargó hasta 25 minutos. Es por ello, que esta última, fue la columna elegida. En todos los casos, a fin de evitar la influencia de los cambios de temperatura ambiente en el laboratorio sobre los tiempos de retención, se termostatózó la columna a 25°C.

Para la optimización de la fase móvil en la separación cromatográfica, después de una extensa revisión bibliográfica, se empleó una fase móvil constituida por una disolución acuosa al 0.1% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo (fase B), este último posee una baja viscosidad y por ende una presión de trabajo baja. Para lograr una buena resolución cromatográfica de los principios

activos, se llevaron a cabo distintos ensayos, modificando los gradientes de composición, empezando siempre con la fase móvil acuosa e incrementando la cantidad de fase móvil orgánica, optimizando tres gradientes de separación diferentes, uno para la determinación de los principios activos en modo de ionización positivo, otro para modo de ionización negativo y por último uno para la detección en modo de adquisición MS^e-TOF.

En la tabla 2 se muestran las condiciones cromatográficas óptimas empleadas para la separación de los principios activos en ambos modos de ionización, positivo y negativo, para la detección por MS-TOF y para la detección mediante MS^e-TOF.

Tabla 2. Condiciones óptimas de separación cromatográfica para la determinación de los principios activos.

Columna	AGILENT Eclipse XDB-C18 (150 mm × 3.0 mm i.d. 3.5 µm)		
Eluyentes	A: Ácido fórmico 0.05% en agua B: Acetonitrilo		
Flujo	0.5 mL/min		
Gradientes:			
-Modo ionización positivo	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	8	0	100
	9	90	10
	12	90	10
- Modo ionización negativo	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	70	30
	7	0	100
	8	70	30
	10	70	30
Modo adquisición MS ^e -TOF	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	99	1
	20	0	100
	21	99	1
	25	99	1

1.2. CONDICIONES DE DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

De los seis principios farmacológicos estudiados en este trabajo, CBZ, FMQ, CPR y ENR fueron ionizados en modo ESI positivo, mientras que DCL e IBU se ionizaron en modo ESI negativo ya que el DCL, a pesar de ionizarse en ambos modos, presenta una mayor sensibilidad en este modo de ionización; en el caso de IBU solamente es posible su ionización en modo negativo.

Una vez seleccionados los modos de ionización de cada principio activo, se optimizaron de forma manual los parámetros instrumentales que afectan a la ionización a fin de encontrar la máxima sensibilidad en todos los principios activos al no ser posible un ajuste automático ni individualizado para cada compuesto. En la tabla 3 se detallan las condiciones óptimas de detección de masas empleadas en modo positivo y en modo negativo.

La resolución del espectrómetro masas TOF es de, aproximadamente, 30000 a la mitad de su altura máxima para una m/z 556 (modo ionización positiva) y 22000 para m/z 554 (modo ionización negativa). El voltaje del capilar se fijó a 1.5 kV para la ionización positiva y a 2.0 kV para ionización negativa, con un voltaje de muestreo a 40 V en ambos modos de ionización. Para el espectro de MS los datos se adquirieron en modo continuo entre 50 y 1000 Da, aplicando un tiempo de adquisición de 1 segundo.

La adquisición en modo MS/MS se realizó en las condiciones descritas en la tabla 4, el ión precursor se seleccionó usando el analizador de cuadrupolo, se fragmentó en la celda de colisión aplicando la correspondiente energía de colisión y posteriormente los espectros producidos se registraron en el analizador TOF entre 50 y 800 Da. La adquisición en modo de medida MS^e -TOF fue empleada para la identificación de metabolitos tanto en modo positivo como negativo.

En este modo de medida el detector registra dos espectros completos (espectro sin fragmentación y espectros aplicando una rampa de energías de fragmentación sin selección de ión precursor) simultáneamente en cada tiempo de retención cromatográfico, lo que permite la asignación de metabolitos y compuestos de degradación posteriormente, mediante tratamiento con software específico para tal fin.

Los espectros se adquirieron en el rango de masas 50- 800 Da empleando una energía de fragmentación de 6 eV para generar el espectro de baja energía y una rampa de energías de fragmentación entre 15-30 eV para obtener el espectro de alta energía.

Además se empleó una sonda de entrada de spray de referencia independiente a la de muestra (LockSpray) para garantizar la exactitud y reproducibilidad en todos los análisis.

Como referencia se empleó una disolución de Leucina Encefalina, introducida a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, cuyas condiciones de medida se describen en la tabla 3, utilizándose como masas de referencia 556.2681 para ionización positiva (m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$) y 554.2615 para ionización negativa (m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$), la frecuencia de adquisición del lockSpray se estableció en 30 segundos, lo que significa que cada 30 segundos el flujo de la aguja del lockSpray se introduce en el espectrofotómetro de masas durante 0.3 segundos, dando así al software la posibilidad de realizar una corrección sobre la marcha de la masa exacta del análisis.

La calibración del equipo se realizó diariamente en el rango de m/z 50-1200 con una mezcla de NaOH 0.1 M y ácido fórmico al 10% en AcN:H₂O (80:20 v/v). Para la adquisición y procesamiento de los datos se empleó el software MassLynx (versión 4.1), descrito en el punto 5 de este capítulo.

Las temperaturas de desolvatación y de la fuente de ionización empleadas fueron altas para producir la ionización eficiente de los compuestos debido al alto porcentaje de agua en la fase móvil. Se usó el modo de adquisición de barrido completo (full scan) para la cuantificación de los compuestos, empleando los cromatogramas extraídos de iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$.

El modo de adquisición MS/MS fue empleado para la confirmación de los analitos en las muestras. Para ello, se optimizaron las energías de colisión en el rango de 6-20 eV de modo que produjeran la fragmentación del ión padre en, al menos, un fragmento hijo con una abundancia relativa lo suficientemente elevada para poder identificar posteriormente su presencia en las muestras.

En la tabla 4 se muestran las energías de colisión óptimas para cada compuesto, así como la composición elemental de todos los fragmentos obtenidos en modo MS/MS, el tiempo de retención (T_r), la masa molecular (M_w) y la fórmula molecular. En el caso del IBU la energía de colisión a aplicar tuvo que ser muy baja debido a la enorme fragmentación que dicho compuesto sufre a energías más altas.

Tabla 3. Condiciones óptimas de detección de masas.

Parámetro	Condiciones	
	Positivo	Negativo
Modo de ionización	Positivo	Negativo
Voltaje Capilar (kV)	1.50	2.00
Voltaje Cono(V)	40	
Temperatura Fuente (°C)	100	
Voltaje compensación (V)	80	
Temperatura Desolvatación (°C)	400	
Caudal Gas de Nebulización (L/h) N ₂	30	
CaudalGas Desolvatacion (L/h) N ₂	600	
Condiciones Lockspray	Leucina Encefalina (200 pg/μL, 20 mL/min), en	
	HCOOH al 0.1% en AcN:H ₂ O 1:1 (v/v)	
	lock mass (m/z 556.2681 [M+H] ⁺	
	m/z 554.2615 [M-H])	
	Frecuencia a 30 s, voltaje capilar 2.54 kV.	

Tabla 4. Tiempo de retención, composición elemental de los iones en full MS y MS/MS y energía de colisión óptima para cada analito.

Compuesto	Fórmula molecular	M _w	Ión precursor	m/z	T _r (min)	Energía de colisión (eV)	m/z frag. Iones	Fórmula fragmento
CPR	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.1332	[M + H] ⁺	332.1407	2.7	15	288.1501	C ₁₆ H ₁₉ FN ₃ O
							314.1303	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₂
							245.1084	C ₁₄ H ₁₄ FN ₂ O
							268.1430	C ₁₁ H ₁₇ FN ₆ O
ENR	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₄	359.1645	[M + H] ⁺	360.1723	2.9	15	316.1728	C ₁₈ H ₂₃ FN ₃ O
							342.1618	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₂
							245.1090	C ₁₄ H ₁₄ FN ₂ O
CBZ	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236.0950	[M + H] ⁺	237.1024	5.0	20	194.0964	C ₁₄ H ₁₂ N
FMQ	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	261.0801	[M + H] ⁺	262.0875	5.4	20	244.0776	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂
							202.0305	C ₁₁ H ₅ FNO ₂
							220.0410	C ₁₁ H ₇ FNO ₃
DCL+	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	295.0167	[M + H] ⁺	296.0240	7.2	20	214.04018	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₂
							250.0191	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ N
							278.0135	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ NO
IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.1306	[M - H] ⁻	205.1230	5.3	6	161.1336	C ₁₁ H ₁₈
DCL-	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	295.0167	[M - H] ⁻	294.0081	5.1	20	214.0418	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₂
							215.0504	C ₁₄ H ₁₃ ClNO
							250.0191	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O
							278.0142	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ NO

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE MATRICES VEGETALES

Una vez optimizadas las condiciones de medida en el Q-TOF-MS, se procedió a la puesta a punto del método de tratamiento de muestra, siendo esta una de las etapas más críticas y extensas debido a la complejidad de las matrices vegetales. Para ello se desarrolló y optimizó un método basado en una extracción sólido-líquido que no emplease una posterior limpieza del extracto mediante extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida o microextracción en fase sólida o en fase líquida, ya que este tipo de extracciones, produce muy frecuentemente pérdidas de parte de la matriz vegetal y por tanto mucha información para el posterior procesamiento de las muestras en la búsqueda de posibles metabolitos.

En primer lugar se procedió a la toma de muestra de distintas plantas de *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* y *Salicornia europaea* en un entorno cercano a Doñana, concretamente en el Pinar del Saltillo (Los Pinos) y Marismas del Odiel (Huelva). Las muestras recogidas se limpiaron, liofilizaron, y se homogeneizaron usando un molinillo eléctrico y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Las muestras liofilizadas fueron dopadas (fortificadas) con 5 mL de solución acuosa, de concentración adecuada, conteniendo todos los analitos. Para asegurar una buena fijación a la matriz se dejaron las muestras dopadas 15 minutos en agitación magnética, y en contacto, en reposo, durante aproximadamente 12 horas a 4°C; posteriormente fueron congeladas a -80°C durante 2 horas. Tras la congelación se liofilizaron para eliminar el disolvente.

2.1. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE EXTRACCIÓN

Con el fin de obtener las mejores recuperaciones y reducir el tiempo de análisis, se realizaron diferentes ensayos variando tanto el método de extracción (baño de ultrasonidos o microondas), como las condiciones de tiempo, volumen de reconstitución, la potencia aplicada, la disolución extractante y su volumen. La figura 30 muestra, de forma detallada, las diferentes variables ensayadas, así como (en rojo) los valores que produjeron los mejores rendimientos de extracción de cada una de ellas. La optimización se realizó para todas las matrices vegetales, obteniendo resultados similares para todas ellas.

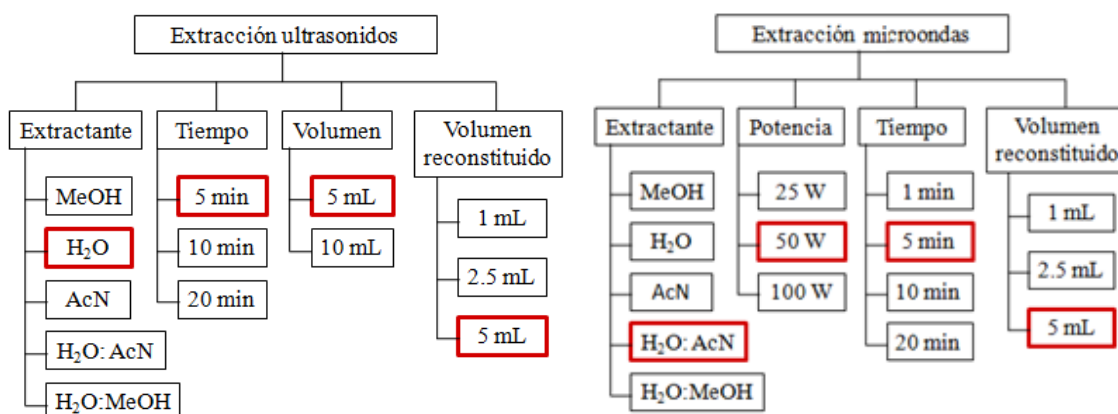


Figura 30. Esquema de optimización del procedimiento de extracción de los analitos seleccionados en las matrices vegetales. En rojo se han señalado las condiciones óptimas.

En la extracción empleando ultrasónicos con agua como agente de extracción durante 5 min, se obtuvieron recuperaciones en el rango de 20-70% produciéndose en los tiempos de extracción más altos de degradaciones de los analitos y un mayor efecto matriz, por lo que se descartó la extracción por ultrasónicos. El resto de condiciones ensayadas produjeron menores rendimientos de extracción.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicó la extracción asistida por microondas, se evaluaron varias potencias, agentes de extracción, tiempos y el volumen final de reconstitución, empleando siempre 5 mL como volumen fijo de extractante. Las mejores recuperaciones de extracción se obtuvieron cuando se utilizó una mezcla de AcN: H₂O (1:1, v/v) a 50 vatios de potencia de microondas durante 5 minutos, se evaporó y se reconstituyó el extracto a un volumen final de 5 mL con agua, sin embargo, algunos analitos, concretamente el ibuprofeno y la ciprofloxacina presentaron recuperaciones en torno al 40-50%.

A continuación, se procedió a evaluar la cantidad de muestra a tratar, dado que cuanto mayor sea la cantidad de muestra que produzca recuperaciones aceptables, menor será la cantidad de analito que se pueda determinar en estas. Para ello se analizaron tres cantidades de muestras dopadas (fortificadas) 1.0, 0.5 y 0.25 g. Los resultados obtenidos en términos de recuperación, se recogen en la tabla 5. No se encontraron grandes diferencias al modificar la cantidad de muestra tratada cuando ésta se situó por debajo de 0.5 g.

Tabla 5. Evaluación de la cantidad de muestra.

Masa	1.0 g	0.5 g	0.25 g
Recuperación	≈ 30%	98-45%	90-50%

Con el fin de mejorar las bajas recuperaciones obtenidas para algunos analitos, se estudiaron dos tratamientos finales diferentes para el extracto. Por un lado, se probó una simple dilución previa antes de la inyección sin etapa de evaporación. Este ensayo se realizó con dos mezclas de disolventes y los resultados, recogidos en la tabla 6, mostraron que una dilución 1:5 del extracto con una mezcla de H₂O:AcN (1:1, v/v) reducen considerablemente el efecto de la matriz, lo que permitió mejorar las recuperaciones hasta un 70-98%.

Tabla 6. Evaluación de la mezcla extractante.

Disolución	AcN:H ₂ O	MeOH:H ₂ O
Recuperación	70-98%	<50%

Por otro lado, buscando una mayor preconcentración del extracto, se ensayó un procedimiento consistente en la evaporación seguida de la reconstitución del extracto con diferentes disolventes o mezclas de disolventes, obteniéndose bajas recuperaciones (tabla 7), probablemente, debido a la supresión de ionización por un efecto de matriz indeseable. Por todo ello, finalmente, se seleccionaron como condiciones óptimas, una extracción con microondas a una potencia de 50 W durante 5 minutos y posterior dilución 1:5 (v/v) con mezcla extractante de H₂O:AcN (1:1, v/v).

Tabla 7. Evaluación de la preconcentración del extracto con distintos disolventes.

Extractante	FA 0.1%	MeOH	AcN	H ₂ O	AcN:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	AcN:FA	Nada
Recuperación	20-50%	< 50%	< 40%	20-80%	≈ 40%	≈ 30%	< 50%	90-50%

De acuerdo con los datos obtenidos se llega al siguiente procedimiento óptimo, que será el que se aplicó a las matrices vegetales y los analitos descritos en esta Memoria.

A 0.5 g de muestra, liofilizada y homogeneizada, se añadieron 5 mL de AcN: H₂O (1:1, v/v), y se sometieron a la extracción mediante microondas aplicando una energía de 50 W durante 5 minutos. Una vez enfriadas, las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 6000 rpm. Un mililitro de la disolución se diluyó con 4 mL de AcN:H₂O (1:1, v/v) y finalmente se filtró a través de un filtro de 0.2 µm antes de su inyección en el UPLC. La figura 31 muestra, de forma esquemática, el procedimiento de extracción propuesto.

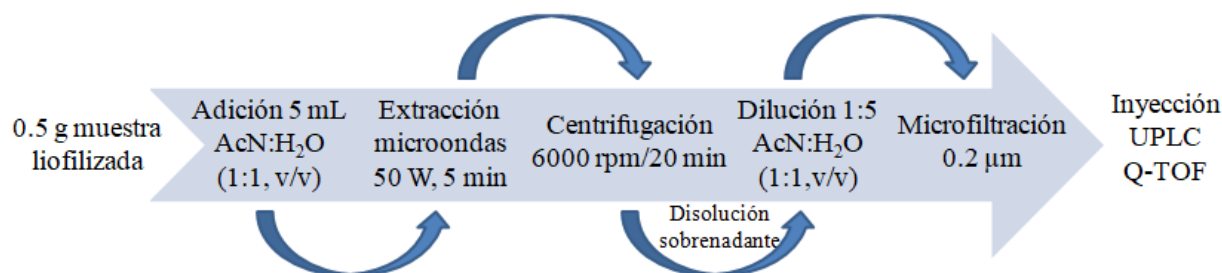


Figura 31. Procedimiento de extracción optimizado para la extracción de los analitos seleccionados en las matrices vegetales.

2.2. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

La definición ISO de validación aplicada a los métodos analíticos podría interpretarse como el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica requerida.

Hoy en día contamos con una extensa variedad de documentación acerca de la validación de los métodos analíticos y varias organizaciones fomentan su difusión e importancia: la AOAC (*Association of Oficial American Chemists*), ICH (*International Confernece on Harmonization*), EURACHEM (*European Analytical Chemistry*), USP (*United States Pharmacopoeia*), CDER (*Center for DRug Evaluation and Research*), EMA (*European Medicines Agency*), etc.

La validación de la metodología empleada en este trabajo se realizó siguiendo las recomendaciones de la ICH (*Guidance for industry* 1996), CDER (*Reviewer guidance validation of chromatography methods*, 1994) y EUROCHEM/CITAC (*Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* second ed, 200, 1998) publicadas en guías para la validación de métodos y procedimientos analíticos EURACHEM 1998, ICH 1996, CDER 1994.

El método propuesto fue validado comprobando los parámetros de calidad del método analítico, para ello se han considerado principalmente los siguientes parámetros: linealidad, sensibilidad (límite de detección y cuantificación, efecto matriz, precisión y recuperación).

2.2.1. LINEALIDAD

En un procedimiento analítico se define linealidad como la capacidad, dentro de un rango determinado, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. Para evaluar la linealidad se fijó como criterio que el coeficiente de regresión lineal de las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los principios activos fuese mayor a 0.99 y la desviación estándar relativa de la pendiente inferior al 5%.

Para ello, se prepararon curvas del calibrado en la matriz enriquecidas a diez niveles distintos de concentración en el rango de 0.5 a 500 ng·mL⁻¹. Los resultados obtenidos para todos los compuestos analizados en las tres matrices diferentes cumplieron el criterio establecido obteniéndose valores entre 0.9991 y 0.9967 para el coeficiente de regresión y desviaciones estándar relativas menores del 5% en todos los casos en el rango de concentraciones estudiado.

2.2.2. SENSIBILIDAD: LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se define sensibilidad, como la pendiente de la curva de calibrado a una concentración concreta de analito, pero habitualmente no se emplea como tal en los procedimientos de validación analíticos, se utilizan en su lugar, los parámetros que están inversamente relacionados con ella, como son el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

El LOD, se define como la menor concentración o cantidad de analito que proporciona un instrumento, a una señal diferente a la señal del “blanco” o “ruido de fondo”, siendo esta concentración de analito detectada pero no cuantificada, para ello recurriremos al LOQ que es la menor cantidad de analito que puede ser determinada con un nivel razonable de precisión. En la tabla 8 se recogen los LODs y LOQs instrumentales y del método para los seis principios activos en todas las matrices estudiadas.

Los límites de cuantificación (LOQ) para los seis compuestos farmacéuticos FMQ, CBZ, ENR, CPR, DCL+, IBU y DCL- se encuentran en el rango entre 7.22-125 ng·g⁻¹, por lo que el método propuesto presenta la suficiente sensibilidad para su futura aplicación en la determinación de los principios farmacológicos activos en las matrices vegetales que serán sometidas a ensayos de exposición.

2.2.3. PRECISIÓN

Para evaluar la precisión del método se estudiaron la repetibilidad (en un día) y la precisión intermedia (en diferentes días). Para evaluar la repetibilidad se analizaron seis replicados de 0.5 g de muestra liofilizada de cada una de las matrices vegetales a un nivel de $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en el mismo día. Para evaluar la precisión intermedia se analizaron tres replicados de 0.5 g de muestra liofilizada de cada matriz a un nivel de $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en seis días diferentes durante tres semanas. En el caso de la repetibilidad las desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas oscilaron entre el 2.5 y el 4.3%, mientras que los valores de RSD obtenidos para la precisión intermedia oscilaron entre el 5.1 y el 7.2%.

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación instrumentales (ILOD e ILOQ) y los correspondientes del método en cada matriz vegetal.

Matriz			FMQ	CBZ	CPR	ENR	DCL+	IBU	DCL-
ILOD (ng·mL ⁻¹)			0.31	0.25	0.42	0.44	0.56	1.51	1.43
ILOQ (ng·mL ⁻¹)			1.03	0.83	1.40	1.47	1.87	5.03	4.77
LOD (ng·g ⁻¹)	<i>Salicornia eu.</i>	Tallo	5.72	6.25	5.25	6.41	4.26	20.8	15.3
		Raíz	5.54	6.16	4.21	5.92	2.16	18.3	13.2
	<i>Juncus sp.</i>	Tallo	4.85	5.48	5.31	7.92	8.47	30.2	22.1
		Raíz	4.64	4.83	4.95	6.54	6.32	10.9	14.8
	<i>Lavandula dentata</i>	Hoja	3.78	4.62	5.32	9.22	7.21	25.2	15.7
		Tallo	7.75	6.25	10.5	11.0	14.0	37.7	35.7
		Raíz	5.22	5.45	6.41	5.38	7.35	32.5	15.7
LOQ (ng·g ⁻¹)	<i>Salicornia eu.</i>	Tallo	19.1	20.8	17.5	21.4	14.2	69.3	51.0
		Raíz	18.5	20.5	14.0	19.7	7.22	61.0	44.1
	<i>Juncus sp.</i>	Tallo	16.2	18.3	17.7	26.4	28.2	101	73.7
		Raíz	15.5	16.1	16.5	21.8	21.1	36.3	49.3
	<i>Lavandula dentata</i>	Hoja	12.6	15.4	17.7	30.7	24.0	84.0	52.3
		Tallo	25.8	20.7	35.0	36.7	46.7	125	119
		Raíz	17.4	18.2	21.4	17.9	24.5	108	52.3

2.2.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ

Tal y como ha sido descrito previamente [193] matrices complejas, como las de esta tesis, producen muy frecuentemente el efecto matriz al emplear la fuente de electrospray como fuente de ionización en espectrometría de masas. Por ello, generalmente, se suele recurrir a la calibración en la misma matriz (*matrix-matched calibration*). El efecto matriz fue evaluado por comparación de las pendientes de las rectas obtenidas mediante calibrado externo a partir de patrones preparados en el disolvente por dilución de la disolución madre concentrada y de la recta preparada en la propia matriz (*matrix-matched calibration*) para cada parte de la planta analizada (raíz, tallo y hoja) y cada tipo de matriz vegetal estudiada. Se calculó un porcentaje de efecto matriz (ME) a partir de la expresión:

$$ME(\%) = \left[\frac{S_m}{S_e} - 1 \right] \times 100$$

Donde

S_m es la pendiente de la recta obtenida en la matriz y S_e es la pendiente de la recta de calibrado externo.

Considerando que valores igual a cero implican ausencia de efecto matriz, valores superiores a cero implican realce de la ionización y valores menores a cero implican supresión de la ionización. Concretamente, valores de ME por debajo del 20% fueron considerados como un bajo efecto matriz, valores en el rango del 20 al 40% fueron considerados efecto matriz medio, mientras que los valores en el intervalo del 40 al 60% fueron considerados como efecto matriz alto, siendo considerados valores superiores al 60% un efecto matriz muy alto.

En la figura 32 se muestran los porcentajes de efecto matriz obtenidos en el análisis de las distintas partes de las plantas analizadas. Como puede apreciarse, ENR y CPR son los compuestos que en genral sufren un gran efecto matriz, sin embargo el mayor efecto matriz lo presenta el IBU en *Juncus sp.* La FMQ fue el compuesto que presentó menor efecto matriz, en torno al 30% en matriz *Salicornia eu.* y alrededor del 10% para el resto de matrices vegetales. La existencia de efecto matriz obligó, por tanto, al empleo de un procedimiento de calibración en la propia matriz (*matrix-matched calibration*) para el análisis cuantitativo de los compuestos estudiados.

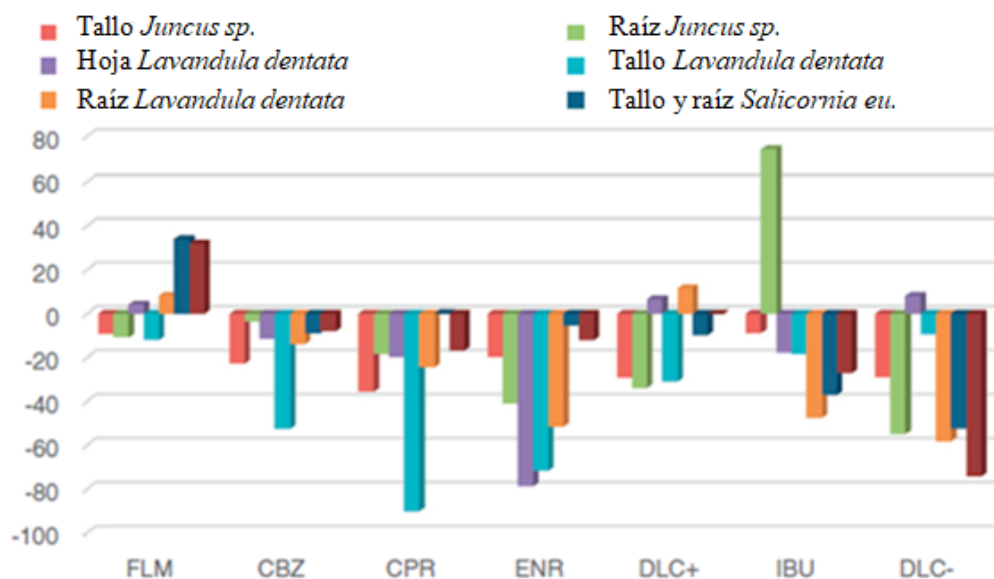


Figura 32. Representación gráfica de los porcentajes del efecto matriz (ME) en las diferentes matrices vegetales estudiadas.

2.2.5. EXACTITUD: ENSAYOS DE RECUPERACIÓN

La exactitud de un método analítico marca la cercanía de un resultado al valor considerado como real. Para evaluar la exactitud existen varios procedimientos:

- Aplicación del método a un material de referencia certificado (CRM).
- Comparación de resultados con un método normalizado.
- Realización de ensayos de recuperación mediante fortificación de muestras.

Puesto que no se disponen de materiales de referencia que contengan a los analitos en nuestras matrices, ni métodos normalizados para estas matrices, se recurrió a la realización de ensayos de recuperación sobre muestras fortificadas de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.1. Los porcentajes de recuperación se calcularon a partir de triplicados como porcentaje de compuesto extraído, a dos niveles de concentración: bajo ($50 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ para modo ESI+ y $150 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ para modo ESI-) y alto ($500 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$).

Como se puede observar en las tablas 9 y 10, en general, las recuperaciones se encuentran en el rango del 60 al 107%, destacando las altas recuperaciones obtenidas para la CBZ en todas las matrices evaluadas; en general las recuperaciones de ENR y CPR fueron aproximadamente del 70%, lo que concuerda con lo descrito previamente por otros autores Hu et al. [194]. El IBU mostró recuperaciones de alrededor del 70% en la mayoría de las matrices, mientras que el DCL mostró

recuperaciones entre el 80 y el 90%. La FMQ fue el principio activo que mostró más dependencia con la matriz, ya que los resultados obtenidos para el tallo fueron en todos los casos entre el 90 y 100%; sin embargo, se obtuvieron bajas recuperaciones, alrededor del 60%, en la raíz de la *Salicornia eu.* y *Lavandula dentata*.

Tabla 9. Recuperaciones obtenidas para FMQ, CBZ y CPR en las diferentes matrices vegetales.

	Matriz	FMQ		CBZ		CPR	
		50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹
<i>Salicornia europaea</i>	Tallo	100 ± 15	105 ± 10	100.9 ± 7.6	90.3 ± 5.7	75.7 ± 2.8	69.2 ± 5.6
	Raíz	67.1 ± 6.4	87.1 ± 10	66.5 ± 0.6	67.1 ± 6.5	75.7 ± 0.2	73.2 ± 6.5
<i>Juncus sp.</i>	Tallo	89.6 ± 8.4	77.3 ± 9.0	99.5 ± 1.3	89.9 ± 9.4	72.1 ± 0.5	65.3 ± 7.9
	Raíz	97.7 ± 5.5	87.6 ± 5.9	100 ± 8.7	97.7 ± 3.4	71.2 ± 3.6	81.6 ± 7.3
<i>Lavandula dentata</i>	Hoja	100 ± 8.9	90.1 ± 11	88.4 ± 5.4	90.6 ± 9.9	70.4 ± 2.2	77.0 ± 8.4
	Tallo	87.8 ± 7.8	97.8 ± 12	77.5 ± 0.2	77.8 ± 7.2	78.2 ± 2.3	82.3 ± 4.9
	Raíz	60.1 ± 2.2	70.3 ± 5.2	107 ± 8.9	80.1 ± 6.2	72.5 ± 0.3	66.8 ± 2.6

Tabla 10. Recuperaciones obtenidas para ENR, DCL e IBU en las diferentes matrices vegetales.

	Matriz	ENR		DCL		IBU	
		50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	150 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹
<i>Salicornia europaea</i>	Tallo	62.5 ± 1.5	71.2 ± 3.6	95.6 ± 3.4	99.8 ± 2.4	75.2 ± 19	69.8 ± 7.6
	Raíz	74.1 ± 0.2	75.6 ± 6.9	61.5 ± 3.8	89.2 ± 7.6	82.7 ± 1.1	75.4 ± 4.6
<i>Juncus sp.</i>	Tallo	72.1 ± 0.1	75.0 ± 5.0	101 ± 13	95.1 ± 5.1	69.3 ± 9.4	74.1 ± 7.7
	Raíz	74.5 ± 0.6	78.5 ± 6.4	78.1 ± 1.6	88.8 ± 2.9	65.7 ± 1.1	70.0 ± 6.6
<i>Lavandula dentata</i>	Hoja	71.2 ± 5.2	71.3 ± 4.3	100. ± 6.8	89.7 ± 9.6	81.9 ± 5.1	67.9 ± 2.3
	Tallo	78.3 ± 8.4	77.9 ± 2.3	68.9 ± 3.4	96.3 ± 6.9	70.5 ± 1.5	70.7 ± 4.8
	Raíz	66.9 ± 0.8	74.1 ± 9.3	72.1 ± 1.1	92.8 ± 12	79.4 ± 5.6	73.2 ± 0.9

3. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN

3.1. ENSAYO DE EXPOSICIÓN: *LAVANDULA DENTATA*

Para los ensayos de exposición se utilizaron 8 plantas de *Lavandula dentata*, de 30-40 cm de altura, que se dividieron en dos grupos: seis plantas para el ensayo de exposición y dos plantas como grupo control.

Las plantas del grupo de exposición, por duplicado, fueron regadas con disoluciones acuosas conteniendo los analitos a distintas concentraciones ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $700 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Las plantas fueron regadas cada dos o 3 días (en función de la humedad del sustrato) con 20 mL de esas disoluciones, durante un total de 30 días. Las dos plantas del grupo control fueron regadas durante el mismo tiempo y con el mismo volumen de agua sin analitos.

Cada 7 días, equivalente a tres riegos, se realizaron cortes en cada planta, cortando tanto el tallo como las hojas, y cada tipo de muestra fue sometida al procedimiento de extracción propuesto en la sección 2.1. La muestra correspondiente a la raíz fue tomada, por razones obvias, solo al final del ensayo, cogiendo también una muestra del sustrato. En la figura 33 se muestra el esquema del ensayo de exposición.



Figura 33. Esquema del ensayo de exposición de *Lavándula dentata*.

(* La raíz fue extraída al final del ensayo).

A los siete días, es decir, a la cuarta dosis, las plantas que estaban sometidas a riego con concentraciones altas empezaron a adquirir un leve color amarillo, mientras que el resto de las plantas del ensayo, así como los controles, no experimentaron ningún cambio visual, manteniendo el característico olor a lavanda.

En la segunda semana, no solo las plantas sometidas a altas concentraciones empeoraron drásticamente sino que también las plantas que estaban siendo expuestas a una concentración de disolución intermedia ($700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) empezaron a perder el olor a lavanda.

Al final de la tercera semana, las plantas que fueron dopadas a altas concentraciones estaban prácticamente secas (toda la planta de color gris), con los tallos hacia abajo. Las plantas a las que se les administró una concentración intermedia de disolución sufrieron un cambio muy drástico con una apariencia similar a las plantas expuestas a altas concentraciones. Las expuestas a concentraciones bajas comenzaron a tener algunas hojas lacias, pero manteniendo el olor a lavanda.

En la cuarta semana, solamente las plantas sometidas a bajas concentraciones empeoraron aún más, mientras que el resto de las plantas no mostraron un mayor empeoramiento. Durante todo el ensayo, el grupo de control, regado con agua normal, mantuvo su apariencia normal conservando el olor a lavanda.

3.2. ENSAYO DE EXPOSICIÓN: *JUNCUS SP.*

De igual modo que en el ensayo de *Lavandula dentata*, de un total de ocho plantas, se formaron dos grupos, las plantas sometidas a ensayo de exposición y las plantas control.

Durante la primera semana, se regaron todas las plantas con 20 mL durante todos los días, ya que el *Juncus sp.* es una planta que necesita de un sustrato húmedo. No obstante, este volumen no era suficiente para una planta que necesita tener óptimas condiciones de humedad en el sustrato, puesto que a veces el sustrato estaba seco. Pasados los siete días se realizó el primer corte de los tallos (al carecer la planta de hojas).

En la segunda semana se procedió a aumentar el volumen de riego (50 mL) ya que se apreció una ligera sequedad en el sustrato durante los riegos de la primera semana. Durante esta semana se observó que las plantas sometidas a altas concentraciones de analitos empezaron a adquirir un ligero color amarillo, mientras que las demás no experimentaron ningún cambio visualmente perceptible.

Durante la tercera y cuarta semana, se siguió administrando un volumen de 50 mL a todas las plantas durante todos los días, y realizando los correspondientes cortes de los tallos al final de cada semana, cortando, aproximadamente, de cada planta entre tres y cinco tallos.

En la tercera semana, las plantas expuestas a una concentración intermedia de disolución dopante comenzaron a perder el característico color verde brillante, en tanto que la pareja de plantas expuestas a altas concentraciones perdieron su rigidez, es decir, empezaron a marchitarse, mientras que las plantas sometidas a bajas concentraciones, así como los blancos, no experimentaron ningún cambio durante esta semana.

En la cuarta y última semana de ensayo las plantas expuestas a concentraciones altas e intermedias se marchitaron completamente y las plantas expuestas a bajas concentraciones empezaron a mostrar cambios evidentes de deterioro, adquiriendo un color verde apagado. Las plantas control no manifestaron ningún cambio durante todo el ensayo.

Al final del ensayo, se analizó la raíz de la planta y guardó una parte del sustrato para posteriores análisis.

3.3. ENSAYO DE EXPOSICIÓN: *SALICORNIA EUROPAEA*

En el caso del ensayo de exposición de la *Salicornia europaea*, se partió de 10 plantas de *Salicornia europaea*, cultivadas en fibra de coco, en bandejas de alvéolos de poliestireno de 5 x 5 cm y una densidad de cultivo de unas 2 plantas por cm². Estas plantas fueron suministradas por AGRO-ON (Faro, Portugal). En este caso, para mantener el mismo modo de ensayo que en la *Lavandula dentata* y el *Juncus sp.*, se seleccionaron dos plantas a cada concentración, utilizando las plantas restantes como blancos (cuatro plantas).

Se regaron las plantas con 10 mL de disolución acuosa conteniendo los analitos a distintas concentraciones (10 mg·L⁻¹, 700 µg·L⁻¹ y 10 µg·L⁻¹) cada dos o tres días, regando los controles solamente con agua.

Como en el caso del *Juncus sp.* al no tener esta planta hojas, se cortaron entre 4 y 5 tallos de cada planta después de cada semana de ensayo. Durante la primera semana, las plantas a altas concentraciones experimentaron un gran cambio, perdiendo rigidez en los tallos y adquiriendo un color grisáceo, las plantas expuestas a concentraciones bajas e intermedias perdieron el color verde y carnosidad en los tallos.

En la segunda semana, las plantas expuestas a altas concentraciones empeoraron drásticamente, todos los tallos perdieron rigidez y casi toda la planta estaba marchita. Sin embargo, las plantas sometidas a concentraciones intermedias y bajas no cambiaron con respecto a la semana anterior. En el caso de los blancos, seguían sin experimentar ningún cambio.

Durante la tercera semana, las plantas expuestas a altas concentraciones estaban completamente muertas, en tanto que el resto de las plantas expuestas empeoraron aún más, por lo que el ensayo se finalizó esa semana y no se pudo realizar la cuarta semana de ensayo de exposición. Por su parte las plantas controles se mantuvieron sin cambio.

Al igual que en las anteriores plantas, la raíz fue analizada en última instancia, habiendo dado por finalizado el ensayo.

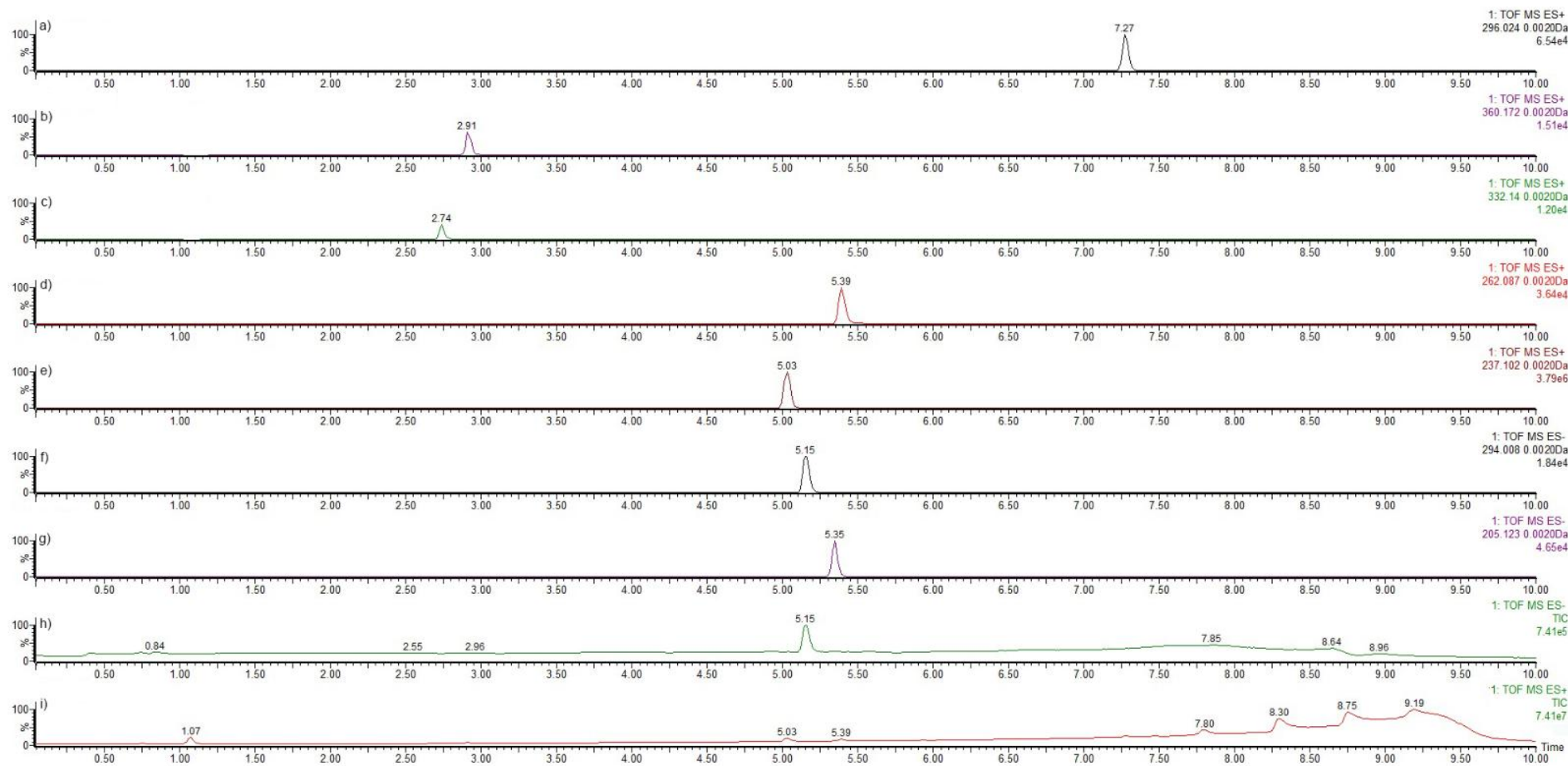


Figura 34. Cromatogramas de iones totales (TIC) y extraídos de una muestra de tallo de *Juncus sp.* con todos los analitos a $25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. a) Diclofenaco+; b) Enrofloxacin+; c) Ciprofloxacin+; d) Flumequina+; e) Carbamazepina+; f) Diclofenaco+; g) ibuprofeno-; h) Cromatograma de iones totales de ionización negativa; i) Cromatograma de iones totales para ionización positiva.

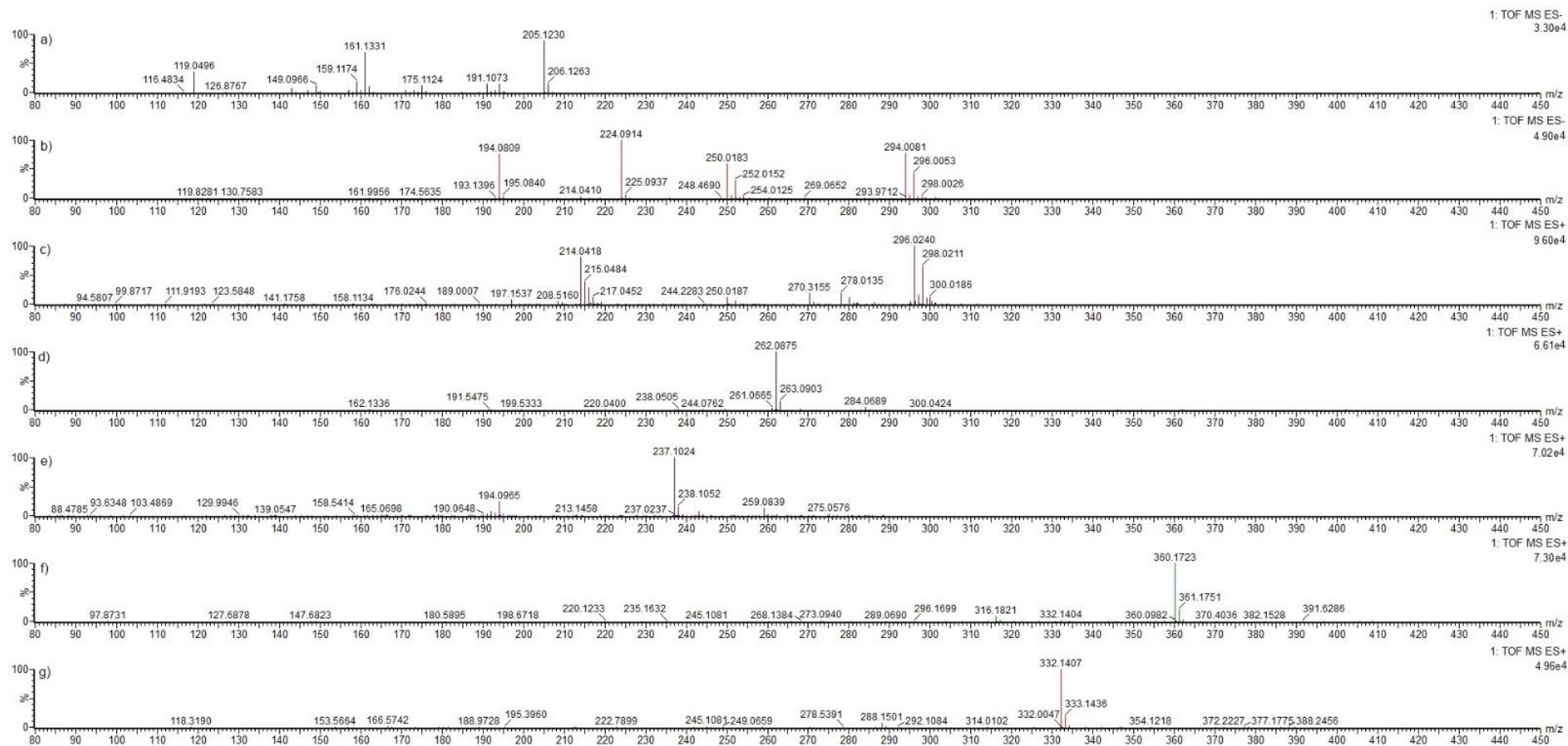


Figura 35. Espectros de masa de una muestra de tallo de *Juncus sp.* con todos los analitos a $25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. a) Ibuprofeno- b) Diclofenaco-; c) Diclofenaco+; d) Flumequina+; e) Carbamazepina+; f) Enrofloxacin+; g) Ciprofloxacin+.

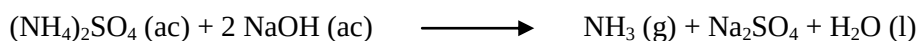
4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN LOS SUSTRATOS

Para determinar el contenido de nitrógeno total orgánico y mineral en las muestras de sustrato de las plantas sometidas a ensayos de exposición *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* y *Salicornia eu.* se utilizó el método Kjeldahl. Este método consiste en una digestión de la muestra por vía húmeda y una valoración ácido-base, siguiendo el método descrito por Moreno Ramón H., Ibáñez Asensio S. [195]. Los sustratos de las distintas matrices vegetales fueron analizados por duplicado tomando 1 g de cada muestra de sustrato de cada ensayo a distinta concentración de analito.

La muestra de suelo es digerida con H_2SO_4 concentrado y una mezcla catalizadora a altas temperaturas para transformar la materia orgánica de la muestra en dióxido de carbono y agua. Los grupos amina o amida se convierten en ión amonio de forma cuantitativa, mientras que el nitrógeno en un estado de oxidación superior (nitratos, nitritos o grupos nitro, azo o azoxi) se transforma en el proceso de la digestión en nitrógeno elemental o en sus óxidos que no quedan retenidos en el frasco colector [195].



Tras la alcalinización de la muestra se realiza la **destilación** del amoniaco resultante que es condensado y recogido en una disolución de ácido bórico, siendo valorado con ácido sulfúrico para determinar el contenido total de nitrógeno, hasta un viraje del indicador Shiro-Tashiro (azul de metileno y rojo de metilo) de verde inicial a violeta [195, 196].



5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS: METABOLYNX

Para la identificación de los posibles metabolitos y productos de degradación obtenidos a partir de la exposición de las tres matrices vegetales a disoluciones acuosas conteniendo los analitos de estudio a distintas concentraciones, se utilizó el software MetaboLynxTM XS Training MassLynx 4.1.

Gracias a este software es posible realizar una rápida detección de un gran número de posibles analitos en la matriz, con un elevado grado de sensibilidad y resolución. Permite

interpretar y convertir los datos en información significativa, con la creación de perfiles de moléculas pequeñas identificando así los posibles metabolitos así como sus correspondientes rutas metabólicas y fórmulas moleculares [197, 198].

Metaboliynx permite la detección e identificación de compuestos xenobióticos para estudios del metabolismo de fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*, al detectarse las biotransformaciones sin requerir previamente predicciones metabolómicas, comparando y contrastando cada muestra metabolizada con una muestra de control (padre) obteniendo los metabolitos esperados. También es posible realizar la búsqueda inesperada de metabolitos en ausencia de un control [198].

Las muestras analizadas mediante UPLC-Q-TOF-MS, son procesadas por el software que utiliza un algoritmo que permite la comparación de los datos de los analitos con los de la muestra de control fijando los picos relacionados con la matriz, evitando que se produzca una lista inmanejable de picos de falsos positivos de metabolitos o asignaciones incorrectas. Este algoritmo evalúa las distintas estructuras del espectro de iones de fragmentos del fármaco, para evaluar e identificar automáticamente los fragmentos sustentándose en una serie de algoritmos químicamente inteligentes que se basa en las desconexiones sistemáticas y factibles de la estructura precursora [198].

En la tabla 11 se muestran las rutas metabólicas seleccionadas para el procesamiento de las muestras obtenidas tras los ensayos de exposición. La selección de las rutas metabólicas se realizó en base a información bibliográfica teniendo en cuenta las más probables para el tipo de matrices y compuestos seleccionados en esta tesis.

Tabla 11. Rutas metabólicas e incrementos de masas de los metabolitos esperados.

Ruta metabólica	Fórmula	Masa (mDa)
Reduction	+H ₂	+2.0157
Hydroxylation	+O	+15.9949
Hydration	+H ₂ O	+18.0106
Sodiado	+Na	+22.9898
2 x Hydroxylation	+O ₂	+31.9898
Acetylation	+C ₂ H ₂ O	+31.9898
Demethylation	-CH ₂	-14.0157
Alcohols dehydration	-H ₂ O	-18.0106
Deethylation	-C ₂ H ₄	-28.0313
Hydroxymethylene loss	-CH ₂ O	-30.0106

6. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Se recolectaron en el propio PND y zonas de su entorno una colección de 150 plantas sobre las que se realizaron las distintas baterías de ensayos enzimáticos descritos en esta memoria. Las muestras se trituraron con molinillo, se ultracongelaron durante un mínimo de tres horas y fueron liofilizadas posteriormente y almacenadas en ultracongelador (-80°C) hasta su extracción para el análisis.

A fracciones de 100 mg de materia seca de cada planta se añadieron 50 mL de cada uno de los siguientes disolventes: hexano, etanol, agua: etanol (1:1, v/v) y acetato de etilo. Tras mantenerlas durante 15 minutos en baño de ultrasonidos, se filtraron a través de papel de filtro y se evaporó el disolvente hasta sequedad. Cada residuo se diluyó con dimetilsulfóxido (DMSO), se mantuvo durante 10 minutos en baño de ultrasonidos, y se agitó en vórtex para garantizar la homogeneización de la disolución. A continuación se centrifugó cada muestra durante 10 minutos a 6000 rpm. Por último, se diluyó otra vez la disolución en DMSO hasta una concentración final en el eppendorf de $3.433 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, para así tener una concentración de $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de cada muestra en el pocillo de las placas utilizadas.

7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ENZIMÁTICAS PARA ENSAYO DE TIROSINASA

Para determinar las condiciones en las cuales la actividad de la enzima tirosinasa es óptima, se realizaron distintos ensayos, modificando las variables: pH, concentración de enzima, y concentración de sustrato. Determinando la actividad de la tirosinasa espectrofotométricamente.

En los ensayos enzimáticos de resto de enzimas, collagenasa, lipoxigenasa y elastasa se utilizaron protocolos optimizados previamente por el grupo de investigación de moléculas bioactivas del Instituto de Química de Niza, Stierlin E. et al [199], utilizando los procedimientos experimentales descritos en esta memoria.

En estos ensayos se empleó enzima tirosinasa de champiñón, al presentar bastantes similitudes estructurales con la enzima tirosinasa de mamíferos, que rara vez se utiliza, al ser bastante costosa [144]. La afinidad de los inhibidores por la enzima de mamíferos es, por lo general, más baja que cuando se usa la de champiñón, lo que da lugar a “falsos positivos”, por ejemplo extractos o moléculas individuales que son inhibidores de la tirosinasa de champiñón, pero

son ineficientes en la tirosinasa de mamíferos. Por ello, en algunos estudios recientes se ha empezado a utilizar extractos brutos de melanocitos humanos como fuente de enzimas [144].

En todos los tests enzimáticos se usaron diferentes inhibidores estándar o control positivo bien conocidos como inhibidores de esta enzimas. Adicionalmente, se usó el DMSO como control negativo, lo que sirvió para determinar el porcentaje de inhibición de cada enzima [144].

De acuerdo a los datos disponibles en la bibliografía, el medio para que una enzima actúe adecuadamente, ha de encontrarse en un tampón fosfatos a un pH entre 6 y 8 [199].

En la figura 36, se muestra la evolución de la actividad enzimática de la tirosinasa en función del pH del tampón fosfato usado.

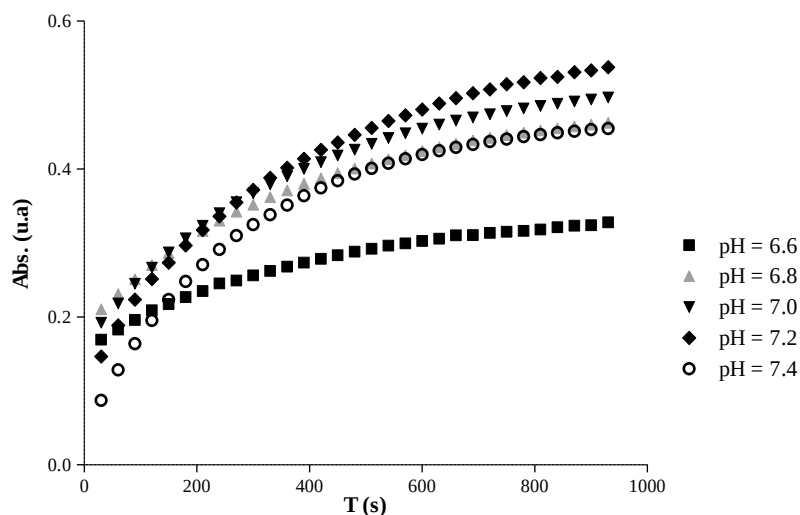


Figura 36. Actividad enzimática de la tirosinasa en función del pH.

En vista de los resultados, la curva más sigmoidea y que muestra mayor estabilidad a temperatura ambiente, corresponde a un pH de 6.8, que es el más ampliamente utilizado en los ensayos realizados con la enzima tirosinasa [201, 202, 203]. Por ello, se escogió un tampón fosfato de pH 6.8 para los ensayos con dicha enzima.

Muestras y controles fueron medidos en las mismas condiciones, añadiendo en el pocillo: 150 μL de enzima diluida de tampón fosfato a pH 6.8, 7.5 μL de DMSO y 100 μL de sustrato. Se concluye que la que mejor curva enzimática se obtiene con una concentración de enzima de 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ya que proporciona una curva sigmoidea para un seguimiento adecuado de la evolución de la reacción enzimática (figura 37).

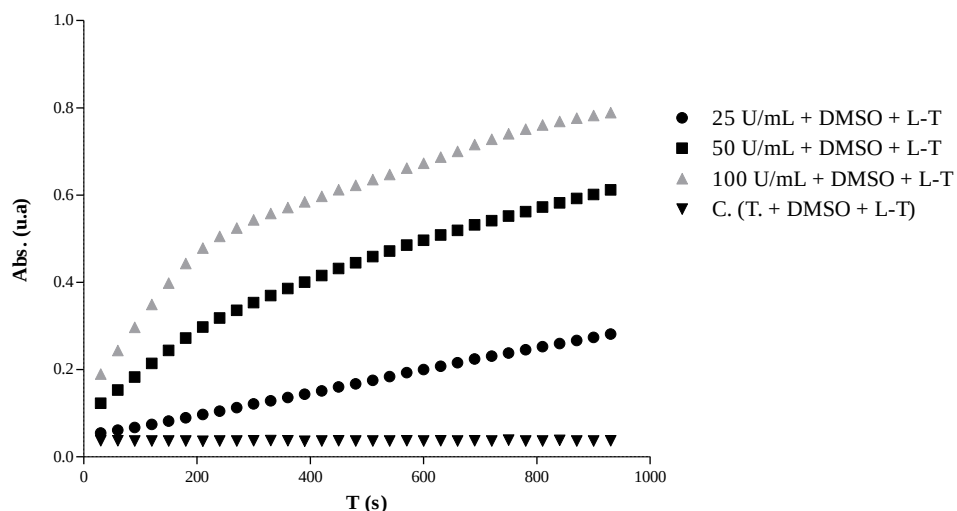


Figura 37. Actividad enzimática de la tirosinasa en función de la concentración de enzima.

Por ello, para llevar a cabo el test enzimático de la enzima tirosinasa, se usó un tampón fosfato a pH 6.8 y una concentración enzimática de $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el pocillo de la placa.

En la determinación de la concentración óptima de sustrato, se realizaron diferentes ensayos variando la concentración de sustrato (0.5, 1, 1.5 y 2 mM), lo que equivale a concentraciones finales en el pocillo de 0.194, 0.388, 0.582 y 0.776 mM, respectivamente, con una concentración de enzima de $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ en tampón fosfato 50 mM de pH 6.8. Como puede observarse en la figura 38, la concentración de sustrato 1 mM es la que presenta una cinética más regular y una curva más sigmoidea al aumentar el tiempo de la reacción enzimática, completándose en su totalidad la reacción enzimática a diferencia de la concentración de 1.5 mM cuya línea de tendencia empieza a perder curvatura lo que no permite que se complete dicha reacción.

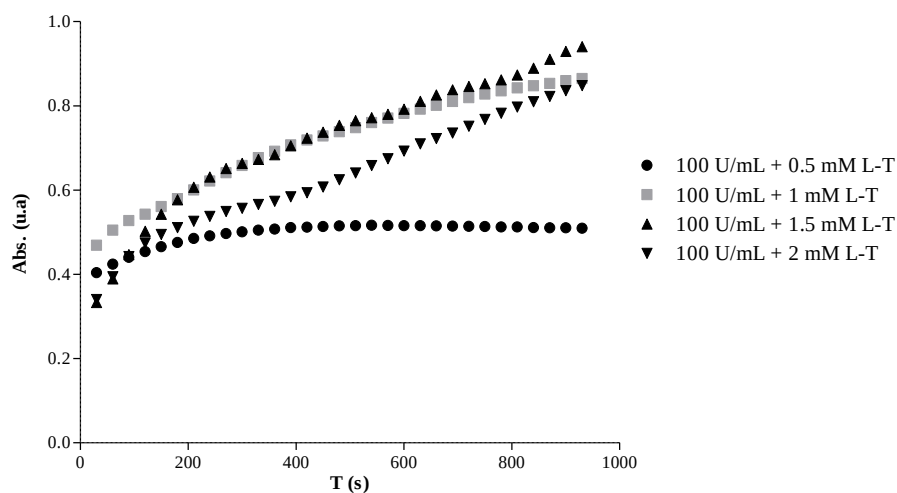


Figura 38. Actividad enzimática de la tirosinasa en función de la concentración de sustrato.

Como inhibidor de referencia se usó el ácido kojico ya que, como se ha mencionado anteriormente, presenta una inhibición competitiva en presencia de la L-Tirosina y no competitiva con el sustrato L-DOPA, mientras que el inhibidor arbutin inhibe la tirosinasa de forma competitiva.

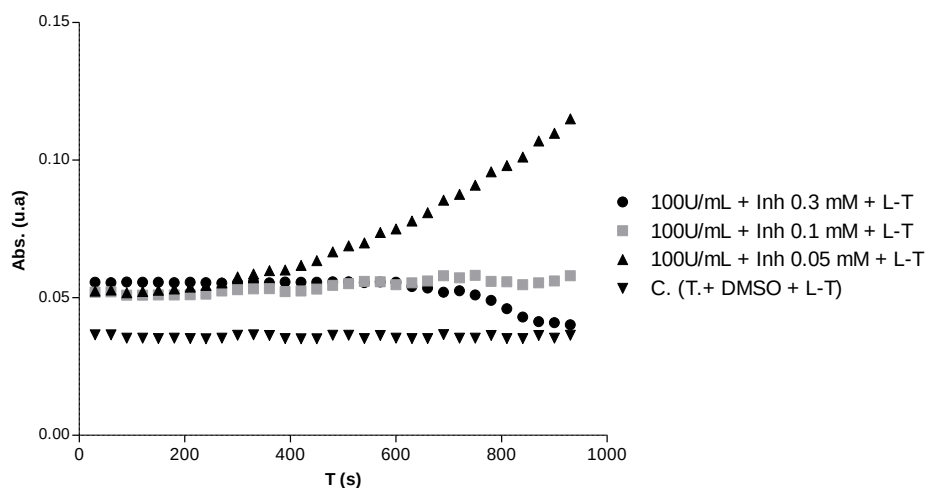


Figura 39. Progreso de la reacción enzimática del ácido kójico con la tirosinasa en función de su concentración, empleando como sustrato L-Tirosina.

A la vista de los resultados se puede decir, que la mejor concentración de inhibidor es de 3.43 mM de ácido kójico (0.1 mM en el pocillo) con una concentración de sustrato L-Tirosina de 1 mM, es decir, 0.388 mM en el pocillo, ya que la curva de la reacción es paralela a la curva del control, lo que indica que no existe actividad enzimática. Esto concuerda con la bibliografía revisada ya que el ácido kójico inhibe de forma competitiva a la enzima en presencia de L-Tirosina [144, 205].

8. PROCEDIMIENTOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

8.1. ENZIMA COLAGENASA

Para la realización del ensayo de la enzima colagenasa, se añadieron de forma automática en una placa de 96 pocillos (Nunc 96 F. Untreated) 150 μL de dicha enzima diluida en una disolución tampón tricina a pH 7.5 seguidos de 7.5 μL de muestra o de inhibidor estándar o cosmético ($3.433 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), o de DMSO, por triplicado, de manera que la concentración final dentro de cada pocillo de enzima colagenasa es de $31 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

El inhibidor estándar utilizado es el ácido tánico y como inhibidor cosmético se usó un extracto de la planta de regaliz, conocida por su actividad inhibitoria y ampliamente utilizada por el grupo de investigación Moléculas bioactivas del Instituto de Química de Niza, en sus ensayos enzimáticos.

A continuación se añadieron de forma manual, en los cuatro últimos pocillos de la placa (de los pocillos número 93 al 96), 157.5 μL de tampón tricina a pH 7.5 y 7.5 μL de DMSO, siendo estos pocillos el control en dicho test enzimático.

Después se procedió a la incubación de la placa enzimática durante 15 minutos y bajo agitación, pasado este tiempo se realizó una lectura de absorbancia de la placa en el espectrofotómetro a 345 nm, siendo esta lectura el blanco de nuestra señal. Una vez determinada la señal del blanco, se adicionaron de forma automática 100 μL de sustrato FALGPA 2 mM en cada pocillo. Por último, se incubó la placa enzimática durante 30 minutos tras 2 minutos de agitación, para que tuviese lugar la reacción enzimática y el sustrato se uniese a la enzima; transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la placa a 345 nm para determinar la señal correspondiente a la muestra.

8.2. ENZIMA TIROSINASA

En el caso de la enzima tirosinasa se utilizó, de igual modo que en el apartado anterior, una placa de 96 pocillos (Nunc. 96 F Untreated) y se añadieron, de forma automática, 150 μL de enzima, obteniendo una concentración final de enzima tirosinasa de $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el pocillo, y a continuación, por triplicado, 7.5 μL de estándar, de DMSO o de muestra. En los últimos pocillos se añadieron de forma automática 157.5 μL de tampón fosfato de pH 6.8 y DMSO, teniendo así todos los pocillos el mismo volumen. El inhibidor cosmético fue el mismo que el empleado en la enzima colagenasa, mientras que se utilizó como inhibidor estándar el ácido kójico, como se ha mencionado anteriormente es un buen inhibidor de dicha actividad enzimática [144].

Posteriormente, se procedió, tras una breve agitación, a la incubación de la placa durante 20 minutos, al resguardo de la luz. Pasado este tiempo se llevó a cabo la lectura de la placa en el espectrofotómetro a 480 nm, longitud de onda característica de la enzima tirosinasa, obteniendo así el valor del blanco del test enzimático. De igual manera que en el caso anterior, se añadió en cada pocillo 100 μL de sustrato L-DOPA o L-Tirosina, consiguiendo de esta forma una concentración de sustrato de 0.388 mM en cada pocillo e incubando tras 2 minutos de agitación la placa tapada con film en oscuridad durante 20 minutos. Pasado este tiempo se realizó la lectura de la placa a 480 nm, para obtener la señal de la muestra.

En la figura 40, se muestra el esquema de distribución de la placa enzimática para los ensayos con las enzimas colagenasa y tirosinasa. Donde M corresponde a las muestras analizadas, todas por triplicado, R el inhibidor cosmético empleado en ambos caso perteneciente al extracto de la planta de regaliz, A son los diferentes ácidos empleados como inhibidores estándares en los distintos ensayos y T la disolución tampón utilizada en cada ensayo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		M 1			M 2			M 3			M 4	
B		M 5			M 6			M 7			M 8	
C		M 9			M 10			M 11			M 12	
D		M 13			M 14			M 15			M 16	
E		M 17			M 18			M 19			M 20	
F		M 21			M 22			M 23			M 24	
G		M 25			M 26			M 27			M 28	
H		M 29			R.		A.		DMSO		T.	

Figura 40. Plan de placa de la enzima colagenasa y la enzima tirosinasa.

8.3. ENZIMA ELASTASA

En una placa de 96 pocillos (Nunc 96 F. Untreated), se añadieron de forma automática en cada pocillo 150 μ L de enzima, 7.5 μ L de muestra, de estándar, de estándar cosmético o de DMSO, por triplicado. En los dos últimos pocillos se añadieron 157.5 μ L de tampón tris. A continuación se agitó la placa durante 2 minutos y se incubó durante 20 minutos, realizando la lectura de la placa, finalmente, a 410 nm para obtener el blanco del test enzimático.

Para finalizar la reacción enzimática se agregaron a cada pocillo 100 μ L de sustrato AAAPnA 2.06 mM (0.8 mM final en el pocillo) disuelto en un tampón tris de pH 8. Posteriormente se procedió, tras dos minutos de agitación, a la incubación durante 40 minutos y lectura a 410 nm para obtener la señal de las muestras.

Como inhibidor estándar se utilizó la quercetina, y como inhibidor cosmético se empleó un extracto de frambuesa HydraBerry (frutos del bosque) extraído por el grupo de investigación, por contener alto contenido de flavonoides. Está documentada en la introducción de este trabajo la elevada actividad inhibitoria de los flavonoides sobre la elastasa [199].

8.4. ENZIMA LIPOXIGENASA

Para la realización del test enzimático de la enzima lipoxigenasa, a diferencia de los otros test enzimáticos, se utilizó una placa de 96 pocillos Costar UV transparente, por la necesidad de medir en el ultravioleta (235 nm).

Se añadieron de forma automática 150 μL de enzima lipoxigenasa, obteniéndose una concentración final en el pocillo de $400 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ y posteriormente $7.5 \mu\text{L}$ de muestra ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ final en el pocillo), de estándar o de DMSO, por triplicado.

Al igual que en los anteriores ensayos, se añadieron de forma manual en los últimos pocillos, y a modo de control, $157.5 \mu\text{L}$ de tampón fosfato de pH 8; seguidamente se incubó la placa durante 10 minutos con agitación constante y al resguardo de la luz. Finalizado este tiempo se procedió a realizar la lectura de la placa a 235 nm, obteniendo así el blanco de dicho test enzimático. Se añadieron posteriormente de forma automática 100 μL de la disolución sustrato de ácido linoleico, para obtener 0.388 mM de concentración final en el pocillo. Se procedió a agitar de 2 minutos al resguardo de la luz y se realizó una nueva lectura a 235 nm, obteniéndose así la señal del blanco 2. Finalmente, se procedió a la incubación durante 50 minutos al abrigo de la luz y se realizó la lectura de la señal de muestra a 235 nm.

En la figura 41, se muestra la distribución de la placa para los ensayos de las enzimas elastasa y lipoxigenasa, como en el caso anterior las muestras (M) se analizaron por triplicado y en la última fila de la placa se testaron los inhibidores, quercetina (Q) y el extracto de la planta regaliz (R) así como los controles, DMSO y tampón fosfato (T).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		M 1			M 2			M 3			M 4	
B		M 5			M 6			M 7			M 8	
C		M 9			M 10			M 11			M 12	
D		M 13			M 14			M 15			M 16	
E		M 17			M 18			M 19			M 20	
F		M 21			M 22			M 23			M 24	
G		M 25			M 26			M 27			M 28	
H		M 29			R.		Q.		DMSO		T.	

Figura 41. Plan de placa de la enzima elastasa y la enzima lipoxigenasa.

9. OPTIMIZACIÓN DE LOS TEST ANTIOXIDANTES

9.1. POLIFENOLES

Uno de los métodos tradicionales más empleados para determinar el contenido en polifenoles es el método Folin-Ciocalteu (FC), que se basa en la capacidad reductora de estas sustancias. En esta memoria se ha usado el procedimiento descrito por Herald J.T. et al. [204] que consiste, en esencia, en adicionar en una placa de 96 pocillos, las muestras o el estándar empleado a 75 μL de agua MilliQ, seguidos de 25 μL del reactivo FC, para añadir pasados 6 minutos 100 μL de una solución Na_2CO_3 a 75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y posterior medida de la absorbancia a 765 nm.

En la figura 42 se muestra una placa de dicho test, con lo que se aprecia en la parte superior izquierda el calibrado realizado con el ácido gálico, realizado por triplicado. Las muestras también fueron medidas por triplicado, siguiendo el modelo de placa descrito en la parte experimental.

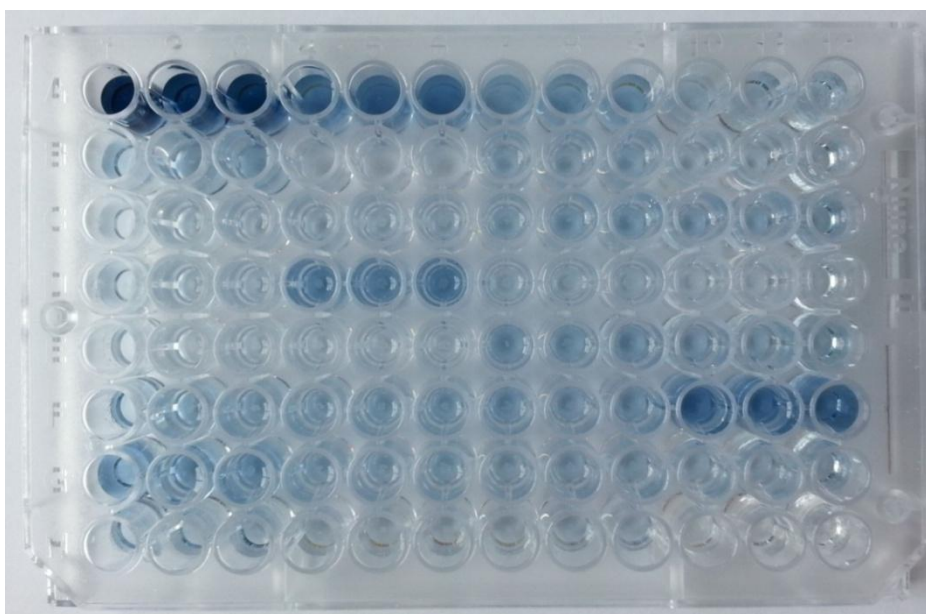


Figura 42. Ejemplo de placa para la determinación de de polifenoles.

El contenido de polifenoles es directamente proporcional a la intensidad del color azul generado en la reacción con el reactivo fosfomolibdato / fosfotungstato. Se observa, por ejemplo, como la muestra correspondiente a los pocillos F10, F11 y F12 posee un elevado contenido de polifenoles, al presentar mayor intensidad de color azul.

9.2. FLAVONOIDES

Para la determinación de flavonoides se empleó, con ligeras modificaciones en lo referente al volumen de las disoluciones empleadas y al reactivo, el método propuesto por Herald J.T. et al. [204]. Se usó quercetina (figura 43) en lugar de catequina (figura 44) ya que la estructura de ambas moléculas es muy similar y las dos presentan dos máximos de absorción, uno correspondiente a 250-285 nm que pertenece a la banda II y otro máximo de absorción entre 320-385 nm correspondiente a la banda I. [200]. La quelación con el aluminio modifica la absorción de la banda I. Se añade acetato de potasio, necesario para tener un medio básico y se produzca dicho quelato y evitar la precipitación del aluminio del AlCl_3 usado.

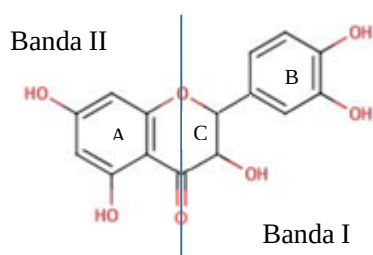


Figura 43. Fórmula estructural quercetina, sus bandas de absorción y numeración de los anillos.

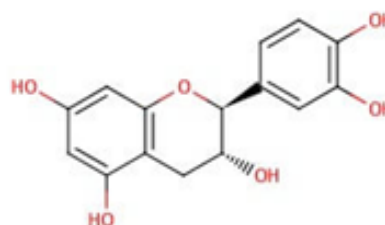


Figura 44. Fórmula estructural catequina.

La figura 45 muestra una placa de pocillos para la determinación de flavonoides. Se observa como en los pocillos de la primera fila, se encuentra el calibrado por triplicado. El punto más alto del calibrado corresponde a una concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se encuentra en los pocillos 1, 2 y 3. A simple vista se constata como la muestra que se encuentra en la posición D1, D2 y D3 tiene mayor contenido de flavonoides que es el resto, ya que presenta una coloración algo verdosa, similar al calibrado.

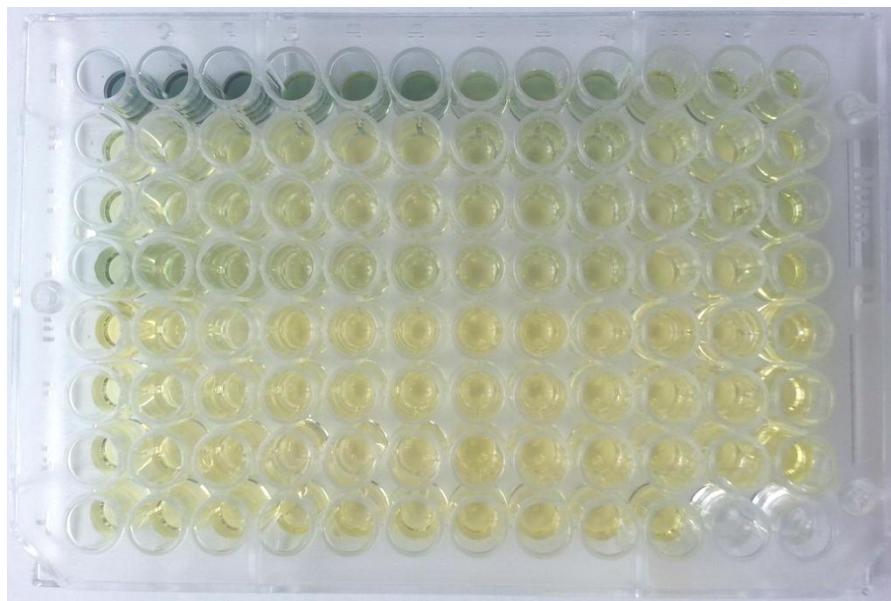


Figura 45. Ejemplo de placa para la determinación de flavonoides.

10. PROCEDIMIENTOS ENSAYOS ANTIOXIDANTES

10.1. FLAVONOIDES

En una placa de 96 pocillos Costar UV transparente, se añadieron 50 μL de agua y 50 μL de DMSO en cada pocillo, seguidos de 15 μL de DMSO o muestra de concentración $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en DMSO ($100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentración final en los pocillos). La gama de calibración estándar de quercetina hidratada se realizó por triplicado en los pocillos de las dos primeras filas de $250 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración final en el pocillo.

Posteriormente se añadieron 10 μL de una solución de AlCl_3 de 100 g/L, 15 μL de una disolución de acetato de potasio 1 M y 100 μL de agua MilliQ. A continuación se incubó la placa durante 40 minutos, en oscuridad, y se procedió a leer la placa en el espectrofotómetro a 415 nm.

En la figura 46 se muestra el plan de la placa en el ensayo de flavonoides, realizando un calibrado descendente de quercetina en las primeras filas de la placa Costar UV transparente y testando cada muestra por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Estandar 1 250 µg/mL			Estandar 2 125 µg/mL			Estandar 3 75 µg/mL			Estandar 4 25 µg/mL	
B		estandar 5 5 µg/mL			M 1			M 2			M 3	
C		M 4			M 5			M 6			M 7	
D		M 8			M 9			M 10			M 11	
E		M 12			M 13			M 14			M 15	
F		M 16			M 17			M 18			M 19	
G		M 20			M 21			M 22			M 23	
H		M 24			M 25			M 26			DMSO	

Figura 46. Plan de placa de flavonoides.

10.2. POLIFENOLES

Como en los casos anteriores, en una placa de 96 pocillos (Nunc 96 F. Untreated), se añadieron 75 µL de agua MilliQ en cada pocillo, seguidos de 15 µL de DMSO, de estándar de calibración ácido gálico ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o de muestra a concentración $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ final en el pocillo) en DMSO. A continuación, se realizó una primera lectura de la placa a 765 nm, después se adicionaron 25 µL de una disolución Folin-Ciocalteu /H₂O MilliQ (1:1) y se incubó la placa durante 6 minutos bajo agitación en ausencia de luz. Seguidamente se añadieron 100 µL de una solución Na₂CO₃ de $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, se cubrió la placa tapada con un film y se mantuvo en un lugar oscuro durante 90 minutos.

Transcurrido este tiempo se realizó la última lectura de la placa a 765 nm, consiguiendo con ella el valor de la absorbancia de las muestras.

La figura 47 muestra la distribución de la placa empleada para determinar el contenido de polifenoles de las muestras analizadas, siendo M, el número de muestra, la cual se introduce por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Estandar 1 250 µg/mL			Estandar 2 100 µg/mL			Estandar 3 50 µg/mL			Estandar 4 25 µg/mL	
B		estandar 5 12.5 µg/mL			Estandar 2 6.25 µg/mL			M 1			M 2	
C		M 3			M 4			M 5			M 6	
D		M 7			M 8			M 9			M 10	
E		M 11			M 12			M 13			M 14	
F		M 15			M 16			M 17			M 18	
G		M 19			M 20			M 21			M 22	
H		M 23			M 25			M 25			DMSO	

Figura 47. Plan de placa de polifenoles.

10.3. DPPH

Para el caso de la determinación de los antioxidantes por el método de DPPH. Para ello se añadieron de forma automática en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc 96 F. Untreated) 150 µL de una mezcla 50:50 (v/v) EtOH/tampón acetato de pH 5.4 de concentración 0.1 M.

Para obtener una concentración final de la muestra en cada pocillo de 100 µg·mL⁻¹ se adicionaron 7.5 µL de cada muestra de extracto vegetal a una concentración de 3.433 mg·mL⁻¹, salvo en los nueve últimos pocillos, en los cuales se añadieron 7.5 µL de Trolox, de DMSO o bien de la mezcla 50:50 (v/v) EtOH/Tampón acetato pH 5.4 (0.1 M).

Antes de realizar la lectura de la placa a 517 nm se procedió a la agitación la misma durante 2 minutos en ausencia de luz. Concluida la lectura de la placa se añadió a todos los pocillos 100 µL de disolución sustrato DPPH preparada en etanol 386.25 mM, obteniendo de esta forma una concentración final de sustrato en cada pocillo de 150 µM.

Después de una agitación de 2 minutos a la oscuridad se llevó a cabo la segunda lectura de la placa a 517 nm, adquiriendo así el valor de absorbancia del segundo control de la placa. Posteriormente se dejó la placa en un lugar oscuro, durante 30 minutos, para que tuviese lugar la reacción de DPPH, y se realizó una última lectura a 517 nm, obteniendo así la señal de la muestra.

En la figura 44 de muestra el plan de la placa en el ensayo de DPPH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		M 1			M 2			M 3			M 4	
B		M 5			M 6			M 7			M 8	
C		M 9			M 10			M 11			M 12	
D		M 13			M 14			M 15			M 16	
E		M 17			M 18			M 19			M 20	
F		M 21			M 22			M 23			M 24	
G		M 25			M 26			M 27			M 28	
H		M 29			QT 40			Trolox			DMSO	

Figura 48. Plan de placa de DPPH.

11. TRATAMIENTO DE DATOS

Los datos de lectura de absorbancia se adquirieron con el software SoftMaxPro (Molecular Devices, Wokingham, Berkshire, Reino Unido) y los porcentajes de inhibición de las enzimas tirosinasa, elastasa y lipoxigenasa, así como de actividad antioxidante fueron calculados con el software Prism (GraphPad Software, La Jolla; California, EE. UU).

Como se hicieron lecturas por triplicado para cada muestra, primero se realizó la media con su respectiva desviación estándar, se corrigieron los valores obtenidos con la absorbancia del DMSO, (OD control), siguiendo la fórmula:

$$I\% = [(OD \text{ control} - OD \text{ muestra}) / OD \text{ control}] * 100$$

Siendo OD la densidad óptica.

Todos los valores se corrigen con la medida del blanco correspondiente a la absorbancia de la muestra antes de la adición del sustrato, es decir, la primera lectura de la placa.

Para el caso de las muestras del ensayo enzimático de la collagenasa se empleó la fórmula:

$$I\% = [OD \text{ muestra} / (OD \text{ blanco} - OD \text{ control})] * 100$$



CHAPITRE III

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre traite d'abord de l'optimisation, du développement et de la validation d'une méthode d'analyse utilisant la chromatographie liquide avec spectrométrie de masse quadripolaire/détection du temps de vol (UPLC-QTOF-MS) pour identifier et quantifier six principes pharmacologiques actifs dans les matrices végétales *Lavandula dentata*, (feuilles, tige et racines) *Salicornia europaea* (tige et racines) et *Juncus sp.* (tige et racine).

Les différents tests d'exposition auxquels les matrices végétales ont été soumises sont également décrits en détail, évaluant l'absorption de ces composés dans chacune des espèces végétales, ainsi que l'apparition de métabolites possibles des composés fournis.

Enfin, les procédures suivies pour l'optimisation des différents tests enzymatiques et antioxydants sont décrites, ainsi que le traitement d'extraction auquel a été soumise la récolte de 150 plantes autour du Parc National de Doñana, et optimisation dans les différents tests enzymatiques et antioxydants pour l'identification ultérieure des fractions positives, le cas échéant.

1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

1.1. OPTIMISATION DE LA SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

L'objectif est d'obtenir une séparation chromatographique adéquate des six principes actifs pharmacologiques sélectionnés dans un délai raisonnable, donc plusieurs aspects ont été pris en compte pour l'optimisation: le choix de la colonne chromatographique, l'optimisation des paramètres liés à la sensibilité et la sélectivité et les conditions de détection.

1.1.1. CHOIX DE LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE

En tenant compte de la littérature existante, différents types de colonnes chromatographiques ont été testés. Dans presque tous les travaux qui impliquent la séparation d'analytes avec des caractéristiques identiques ou similaires à celles des composés analysés dans cette thèse, des colonnes en phase inverse ont été utilisées, avec une phase stationnaire de C18 apolaire, de sorte que les principes actifs élueront de plus polaires aumoins polaires.

Au départ, une colonne ACQUITY UPLC[®] BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) a été choisie, pour son pouvoir de élevé résolution en utilisant un système chromatographique UPLC. Malgré l'obtention d'une bonne séparation chromatographique, la colonne présentait des problèmes d'occlusion et de détérioration avec les échantillons réels en causant des surpressions nonassumables. Une colonne ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2.1 x 12.5 mm, 5 μ m) a ensuite été testée avec une phase stationnaire moins hydrophobe, augmentant également la taille et la longueur des particules pour obtenir une meilleure séparation. Dans ce cas, les résultats en termes de résolution de crête n'étaient pas entièrement satisfaisants. Enfin, une colonne Agilent Eclipse XDB-C18 (3.0 x 150 mm, 3.5 μ m) a été testée, ce qui a permis une bonne résolution et une séparation des pics dans un temps raisonnable, puisque le dernier composé est élué en 7 et le développement chromatographique est terminé en 12 minutes en mode positif et en 10 minutes en mode négatif. C'est pour cette raison que c'est cette dernière colonne qui a été choisie. Dans tous les cas, afin d'éviter l'influence des changements de température ambiante dans le laboratoire sur les temps de rétention, la colonne a été thermostatée à 25°C.

Quant à la phase mobile, après une revue bibliographique approfondie, une phase mobile constituée d'une solution aqueuse d'acide formique (A) à 0.1 % et d'acétonitrile (B) a été testée, cette dernière ayant une faible viscosité et donc une faible pression de service. Afin d'obtenir une bonne résolution chromatographique des principes actifs, différents tests ont été réalisés, modifiant les gradients de composition, en commençant toujours par la phase mobile aqueuse et en augmentant la quantité de phase mobile organique, en optimisant trois gradients de séparation

différents, un pour la détermination des principes actifs en mode ionisation positive, un pour le mode ionisation négative et enfin un pour la détection en mode acquisition MS^e-TOF.

Le tableau 2 montre les conditions chromatographiques optimales utilisées pour la séparation des principes actifs dans les modes d'ionisation positive et négative pour la détection MS-TOF et pour la détection MS^e-TOF.

Tableau 2. Conditions de séparation chromatographique optimales pour la détermination des principes actifs.

Colonne	AGILENT Eclipse XDB-C18 (150 × 3.0 mm i.d. 3.5 µm)		
Éluants	A: Acide formique 0.05 % dans l'eau B: Acetonitrile		
Flux	0.5 mL/min		
Gradient:			
-Mode d'ionisation positive	Temps (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	8	0	100
	9	90	10
	12	90	10
- Mode d'ionisation négative	Temps (min)	A (%)	B (%)
	0	70	30
	7	0	100
	8	70	30
	10	70	30
-Mode d'acquisition -MS ^e -TOF	Temps (min)	A (%)	B (%)
	0	99	1
	20	0	100
	21	99	1
	25	99	1

1.2 CONDITIONS DE DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Des six principes pharmacologiques étudiés dans ce travail, CBZ, FMQ, CPR et ENR ont été ionisés en mode ESI positif, tandis que DCL et IBU ont été ionisés en mode ESI négatif car DCL présentent une sensibilité plus élevée dans ce mode d'ionisation bien que les deux modes soient ionisés; dans le cas des IBU, seule une ionisation en mode négatif est possible.

Une fois les modes d'ionisation de chaque principe actif sélectionnés, les paramètres instrumentaux affectant l'ionisation ont été optimisés manuellement afin de trouver la sensibilité maximale dans tous les principes actifs puisqu'un ajustement automatique et individualisé pour chaque composé n'était pas possible. Le tableau 3 détaille les conditions optimales de détection de masse utilisées en mode positif et négatif.

La résolution du spectromètre de masse TOF est d'environ 30000 à la moitié de sa hauteur maximale pour m/z 556 (mode ionisation positive) et 22000 pour m/z 554 (mode ionisation négative). La tension capillaire a été fixée à 1.5 kV pour l'ionisation positive et 2.0 kV pour l'ionisation négative, avec une tension d'échantillonnage à 40 V dans les deux modes d'ionisation. Pour le spectre MS, les données ont été acquises en mode continu entre 50 et 1000 Da, en appliquant un temps d'acquisition de 1 seconde.

L'acquisition en mode MS/MS a été réalisée dans les conditions décrites dans le tableau 4, l'ion précurseur a été sélectionné à l'aide de l'analyseur quadripolaire, fragmenté dans la cellule de collision en appliquant l'énergie de collision correspondante et les spectres produits ont ensuite été enregistrés dans l'analyseur TOF entre 50 et 800 Da. L'acquisition du mode de mesure MSe-TOF a été utilisée pour l'identification des métabolites en mode positif et négatif.

Dans ce mode de mesure, le détecteur enregistre deux spectres complets (spectre non fragmenté et spectre en appliquant une rampe d'énergie de fragmentation sans sélection d'ions précurseurs) simultanément à chaque temps de rétention chromatographique, ce qui permet l'affectation ultérieure des métabolites et des composés de dégradation, au moyen d'un traitement par logiciel spécifique à cette fin.

Les spectres ont été acquis dans la gamme de masse de 50 à 800 Da en utilisant une énergie de fragmentation de 6 eV pour générer le spectre de faible énergie et une rampe d'énergie de fragmentation de 15 à 30 eV pour obtenir le spectre de haute énergie.

De plus, une sonde d'entrée de pulvérisation de référence distincte (LockSpray) a été utilisée pour assurer la précision et la reproductibilité de toutes les analyses. Une solution d'encéphaline

leucine, introduite à un débit de $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, dont les conditions de mesure sont décrites dans le tableau 3, a été utilisée comme masses de référence 556.2681 pour l'ionisation positive (m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$) et 554.2615 pour l'ionisation négative (m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$), la fréquence d'acquisition lockSpray a été réglée sur 30 secondes, ce qui signifie que toutes les 30 secondes le débit de l'aiguille lockSpray est introduit dans le spectrophotomètre de masse pendant 0.3 seconde, donnant ainsi au logiciel la possibilité de corriger à la volée la masse exacte de l'analyse.

L'étalonnage de l'équipement a été effectué quotidiennement dans la plage de m/z 50-1200 avec un mélange de NaOH 0.1 M et d'acide formique 10 % dans AcN:H₂O (80: 20 v/v). Le logiciel MassLynx (version 4.1), décrit au point 5 de ce chapitre, a été utilisé pour acquérir et traiter les données.

Les températures de désolvatation et de source d'ionisation étaient élevées pour produire une ionisation efficace des composés en raison du pourcentage élevé d'eau dans la phase mobile. Le mode d'acquisition par balayage complet a été utilisé pour quantifier les composés, en utilisant les chromatogrammes extraits des ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Le mode d'acquisition MS/MS a été utilisé pour confirmer les analytes dans les échantillons, pour lesquels les énergies de collision de l'ordre de 6-20 eV ont été évaluées afin de produire la fragmentation de l'ion parent dans au moins un fragment enfant ayant une abondance relative suffisamment élevée pour pouvoir identifier ultérieurement sa présence dans les échantillons.

Le tableau 4 montre les énergies de collision optimales pour chaque composé, ainsi que la composition élémentaire de tous les fragments obtenus en mode MS/MS. Dans le cas de l'IBU, l'énergie de collision à appliquer devait être très faible en raison de l'énorme fragmentation que subit ce composé à des énergies supérieures.

Tableau 3. Conditions optimales de détection de masse.

Paramètre	Conditions	
Mode d'ionisation	Positif	Négatif
Tension capillaire (kV)	1.50	2.00
Tension du cône (V)	40	
Température source (°C)	100	
Tension de compensation (V)	80	
Température de désolvantation (°C)	400	
Flux gaz de nébulisation (L/h) N ₂	30	
Flux gaz dépoussiérage (L/h) N ₂	600	
Conditions Lockspray	Encéphaline leucine (200 pg/μL, 20 mL/min), dans HCOOH al 0.1 % dans AcN:H ₂ O 1:1 (v/v) lock mass (m/z 556.2681[M+H] ⁺ m/z 554.2615 [M-H] ⁻) Fréquence à 30 s, tension capillaire 2.54 kV.	

Tableau 4. Temps de rétention, composition élémentaire des ions dans la MS et la MS/MS et énergie de collision optimale pour chaque analyte.

Composé	Composition	M _w	Ion précurseur	m/z	T _r (min)	Énergie de collision (eV)	m/z frag. Ions	Formule de fragment
CPR	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.1332	[M + H] ⁺	332.1407	2.7	15	288.1501	C ₁₆ H ₁₉ FN ₃ O
							314.1303	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₂
							245.1084	C ₁₄ H ₁₄ FN ₂ O
							268.1430	C ₁₁ H ₁₇ FN ₆ O
ENR	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₄	359.1645	[M + H] ⁺	360.1723	2.9	15	316.1728	C ₁₈ H ₂₃ FN ₃ O
							342.1618	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₂
							245.1090	C ₁₄ H ₁₄ FN ₂ O
CBZ	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236.0950	[M + H] ⁺	237.1024	5.0	20	194.0964	C ₁₄ H ₁₂ N
FMQ	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	261.0801	[M + H] ⁺	262.0875	5.4	20	244.0776	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂
							202.0305	C ₁₁ H ₅ FNO ₂
							220.0410	C ₁₁ H ₇ FNO ₃
DCL+	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	295.0167	[M + H] ⁺	296.0240	7.2	20	214.04018	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₂
							250.0191	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ N
							278.0135	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ NO
IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.1306	[M - H] ⁻	205.1230	5.3	6	161.1336	C ₁₁ H ₁₈
DCL-	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	295.0167	[M - H] ⁻	294.0081	5.1	20	214.0418	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₂
							215.0504	C ₁₄ H ₁₃ ClNO
							250.0191	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O
							278.0142	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ NO

2. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS DE MATRICES VÉGÉTALES

Une fois les conditions de mesure du Q-TOF-MS optimisées, la méthode de traitement des échantillons a été affinée, l'une des étapes les plus critiques et les plus étendues en raison de la complexité des matrices. À cet effet, une méthode basée sur une extraction solide-liquide a été développée et optimisée, sans nettoyage ultérieur de l'extrait par extraction liquide-liquide, l'extraction en phase solide ou la microextraction en phase solide ou liquide, car ce type d'extraction produit très fréquemment des pertes d'une partie de la matrice végétale et donc beaucoup d'informations pour le traitement ultérieur des échantillons lors de l'obtention des possibles métabolites.

Tout d'abord, des échantillons ont été prélevés sur différentes plantes de *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia europaea* dans un environnement proche de Doñana, notamment à Pinar del Saltillo (Los Pinos) et Marismas del Odiel (Huelva). Les échantillons prélevés ont été nettoyés, lyophilisés et homogénéisés à l'aide d'un broyeur électrique et ont été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

Les échantillons lyophilisés ont été dopés avec 5 mL de solution aqueuse, de concentration adéquate, contenant tous les analytes. Pour assurer une bonne fixation à la matrice, les échantillons dopés ont été laissés 15 minutes en agitation magnétique et en contact, au repos, pendant environ 12 heures à 4°C, puis congelés à -80°C pendant 2 heures. Après congélation, ils ont été lyophilisés pour éliminer le solvant.

2.1 OPTIMISATION DU TRAITEMENT D'EXTRACTION

Afin d'obtenir les meilleures récupérations et de réduire le temps d'analyse, différents tests ont été effectués en variant à la fois la méthode d'extraction (bain ultrasonique ou micro-ondes), ainsi que les conditions de temps, le volume de reconstitution, la puissance appliquée, la dissolution de l'extrait et son volume. La figure 30 montre, en détail, les différentes variables testées, ainsi que (en rouge) les valeurs qui ont produit les meilleurs rendements d'extraction de chacun d'eux. L'optimisation a été effectuée pour toutes les matrices végétales, obtenant des résultats similaires pour toutes.

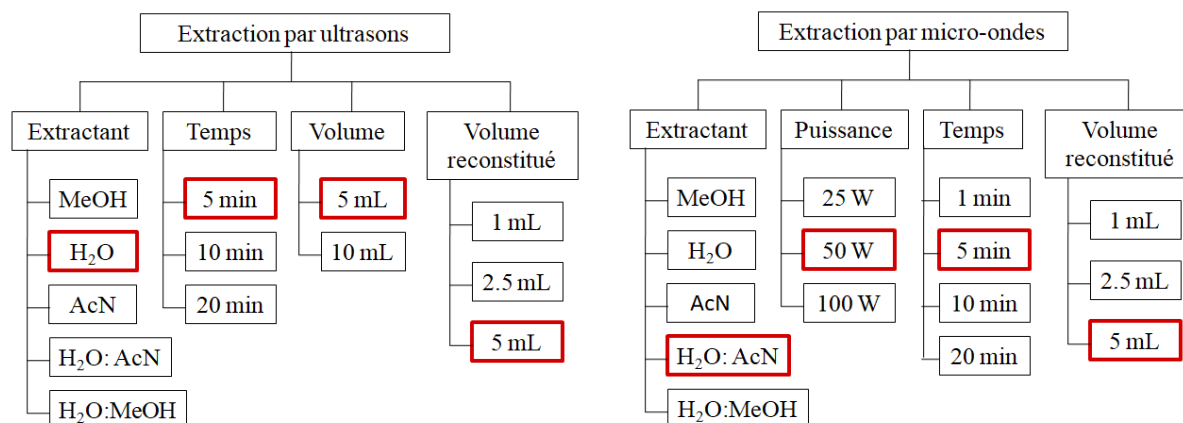


Figure 30. Schéma d'optimisation pour la procédure d'extraction des analytes sélectionnés dans les matrices de l'installation. Les conditions optimales sont indiquées en rouge.

Dans l'extraction par ultrasons avec de l'eau comme agent d'extraction pendant 5 minutes, des taux de récupération de l'ordre de 20-70 % ont été obtenus, produisant les temps de dégradation les plus élevés des analytes et un plus grand effet de matrice, donc l'extraction par ultrasons a été rejetée.

Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque l'extraction assistée par micro-ondes a été appliquée, les différentes puissances, les agents d'extraction, les temps et le volume final de reconstitution ont été évalués, en utilisant toujours 5 mL comme volume fixe de l'extractant. Les meilleures récupérations d'extraction ont été obtenues en utilisant un mélange d'AcN : H₂O (1:1, v/v) à 50 W de puissance micro-ondes pendant 5 minutes, évaporé et reconstitué l'extract à un volume final de 5 mL avec de l'eau, cependant, certains analytes, en particulier l'ibuprofène et la ciprofloxacine, ont présenté des taux de récupération de 40 à 50 % environ.

Ensuite la quantité d'échantillon à traiter a été évaluée, car plus la quantité d'échantillon qui produit des récupérations acceptables est grande, plus la quantité d'analyte pouvant être déterminée dans ces récupérations est faible. Pour ce faire, trois quantités d'échantillons dopés de 1.0, 0.5 et 0.25 g ont été analysées. Les résultats obtenus en termes de récupération sont présentés dans le tableau 5; aucune différence majeure n'a été constatée lors de la modification de la quantité d'échantillon traitée lorsque celle-ci était inférieure à 0.5 g.

Tableau 5. Évaluation de la quantité d'échantillons.

Masse	1.0 g	0.5 g	0.25 g
Récupération	≈ 30 %	98-45 %	90-50 %

Afin d'améliorer les faibles taux de récupération obtenus pour certains analytes, deux traitements finaux différents de l'extrait ont été étudiés. D'une part, une simple pré-dilution a été testée avant injection sans étape d'évaporation. Ce test a été effectué avec deux mélanges de solvants et les résultats, présentés dans le tableau 6, ont montré qu'une dilution de 1:5 de l'extrait avec un mélange de H₂O:AcN (1:1, v/v) réduit considérablement l'effet de la matrice, ce qui permet d'améliorer les taux de récupération jusqu'à 70-98 %.

Tableau 6. Évaluation du mélange d'agent d'extraction.

Dissolution	AcN:H ₂ O	MeOH:H ₂ O
Récupération	70-98 %	<50 %

D'autre part, afin d'obtenir une plus grande pré-concentration de l'extrait, une procédure d'évaporation suivie d'une reconstitution de l'extrait avec différents solvants ou mélanges de solvants a été testée, obtenant de faibles récupérations (tableau 7), probablement dues à la suppression de l'ionisation par un effet de matrice non désiré. Pour toutes ces raisons, une extraction avec des micro-ondes à une puissance de 50 W pendant 5 minutes et une dilution subséquente de 1:5 (v/v) avec un mélange de H₂O : AcN (1:1, v/v) ont finalement été choisies comme conditions optimales

Tableau 7. Evaluation de la pré-concentration de l'extrait avec différents solvants.

Évaporation	FA 0.1%	MeOH	AcN	H ₂ O	AcN:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	AcN:FA	Rien
Récupération	20-50%	< 50%	< 40%	20-80%	≈ 40%	≈ 30%	< 50%	90-50%

Selon les données obtenues, on obtient la procédure optimale suivante, qui sera celle appliquée aux matrices végétales et aux analytes décrits dans ce rapport.

A 0.5 g d'échantillon lyophilisé et homogénéisé, 5 mL de AcN : H₂O (1:1, v/v) ont été ajoutés et soumis à une extraction par micro-ondes en appliquant une énergie de 50 W pendant 5 minutes, puis les échantillons ont été centrifugés pendant 20 minutes à 6000 rpm. Un millilitre de la solution a été dilué avec 4 mL d'AcN : H₂O (1:1, v/v) et finalement filtré à travers un filtre de 0.2 µm avant injection dans l'UPLC. La figure 31 montre schématiquement la procédure d'extraction proposée.

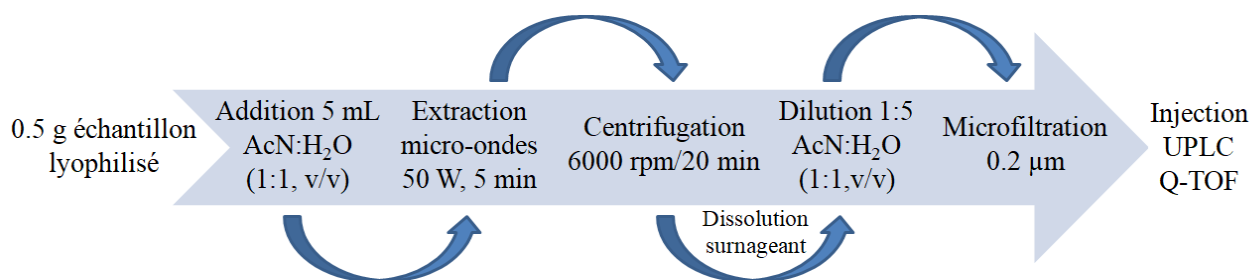


Figure 31. Procédé d'extraction optimisé pour l'extraction des analytes sélectionnés dans les matrices végétales.

2.2. VALIDATION DE LA MÉTHODOLOGIE PROPOSÉE

La définition ISO de la validation appliquée aux méthodes d'analyse pourrait être interprétée comme le processus par lequel il est établi, par des études expérimentales, que la capacité de la méthode satisfait aux exigences de l'application analytique requise.

Aujourd'hui, nous disposons d'une grande variété de documentation sur la validation des méthodes analytiques et plusieurs organisations promeuvent leur diffusion et leur importance, comme l'AOAC (*Association of Official American Chemists*), l'ICH (*International Conference on Harmonization*), EURACHEM (*European Analytical Chemistry*), USP (*United States Pharmacopoeia*), CDER (*Center for Drug Evaluation and Research*), EMA (*European Medicines Agency*), etc.

La validation de la méthodologie utilisée dans ce travail a été effectuée conformément aux recommandations de l'ICH (*Guidance for industry* 1996), du CDER (*Reviewer guidance validation of chromatography methods*, 1994) et d'EUROCHEM/CITAC (*Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* second ed, 200, 1998) publiées dans Guidelines for the validation of analytical methods and procedures EURACHEM 1998, ICH 1996 et CDER 1994.

La méthode proposée a été validée en vérifiant les paramètres de qualité de la méthode d'analyse, pour laquelle les paramètres suivants ont été principalement pris en compte: linéarité, sensibilité (limite de détection et de quantification, effet de matrice, précision et récupération).

2.2.1. LINÉARITÉ

Dans une méthode d'analyse, la linéarité est définie comme la capacité, dans une plage donnée, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

Afin d'évaluer la linéarité, il a été établi comme critère que le coefficient de régression linéaire des lignes d'étalonnage obtenues pour chacun des principes actifs était supérieur à 0.99 et que l'écart type relatif de la pente était inférieur à 5 %.

Pour ce faire, des courbes d'étalonnage ont été préparées dans la matrice enrichie à dix niveaux différents de concentration dans la plage de 0.5 à 500 ng·mL⁻¹. Les résultats obtenus pour tous les composés analysés dans les trois matrices différentes ont satisfait aux critères établis, obtenant des valeurs comprises entre 0.9991 et 0.9967 pour le coefficient de régression et des écarts-types mérores relatifs de 5 % dans tous les cas dans la gamme des concentrations étudiées.

2.2.2. SENSIBILITÉ: LIMITES DE DÉTECTION ET QUANTIFICATION

La sensibilité est définie comme la pente de la courbe d'étalonnage à une concentration spécifique de l'analyte, mais elle n'est généralement pas utilisée en tant que telle dans les procédures de validation analytique ; on utilise plutôt des paramètres qui lui sont inversement liés, comme la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ).

La LOD est définie comme la plus faible concentration ou quantité d'analyte fournie par un instrument, à un signal autre que le signal "blanc" ou "bruit de fond", étant cette concentration d'analyte détectée mais non quantifiée, pour cela nous utiliserons la LOQ qui est la plus faible quantité d'analyte qui peut être déterminée avec un niveau raisonnable de précision. Le tableau 8 montre les limites de détermination et les limites de dosage instrumentales et méthodologiques pour les six principes actifs.

Comme les limites de quantification (LDQ) des six composés pharmaceutiques FMQ, CBZ, ENR, CPR, DCL⁺, IBU et DCL⁻ se situent entre 7.22 et 125 ng·g⁻¹, on peut dire que la méthode proposée présente une sensibilité suffisante pour son application future dans la détermination des principes pharmacologiques actifs des matrices végétales qui seront soumises aux essais d'exposition.

2.2.3. LA PRÉCISION

Pour évaluer la précision de la méthode, on a étudié la répétabilité (sur une journée) et la précision intermédiaire (sur différents jours). Pour évaluer la répétabilité, six répétitions de 0.5 g d'échantillon lyophilisé de chaque matrice végétale ont été analysées à un niveau de $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ le même jour. Pour évaluer la précision intermédiaire, trois répliquats de 0.5 g d'échantillon lyophilisé de chaque matrice ont été analysés à un niveau de $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ sur six jours différents pendant trois semaines. Dans le cas de la répétabilité, les écarts-types relatifs (RSD) obtenus variaient de 2.5 à 4.3 %, tandis que les valeurs RSD obtenues pour la précision intermédiaire variaient de 5.1 à 7.2 %.

Tableau 8. Limites instrumentales de détection et de quantification (ILOD et ILOQ) et méthode correspondante dans chaque matrice végétale.

Matrice			FMQ	CBZ	CPR	ENR	DCL+	IBU	DCL-
ILOD (ng·mL ⁻¹)			0.31	0.25	0.42	0.44	0.56	1.51	1.43
ILOQ (ng·mL ⁻¹)			1.03	0.83	1.40	1.47	1.87	5.03	4.77
LOD (ng·g ⁻¹)	<i>Salicornia eu.</i>	Tige	5.72	6.25	5.25	6.41	4.26	20.8	15.3
		Racine	5.54	6.16	4.21	5.92	2.16	18.3	13.2
	<i>Juncus sp.</i>	Tige	4.85	5.48	5.31	7.92	8.47	30.2	22.1
		Racine	4.64	4.83	4.95	6.54	6.32	10.9	14.8
	<i>Lavandula dentata</i>	Feuille	3.78	4.62	5.32	9.22	7.21	25.2	15.7
		Tige	7.75	6.25	10.5	11.0	14.0	37.7	35.7
		Racine	5.22	5.45	6.41	5.38	7.35	32.5	15.7
LOQ (ng·g ⁻¹)	<i>Salicornia eu.</i>	Tige	19.1	20.8	17.5	21.4	14.2	69.3	51.0
		Racine	18.5	20.5	14.0	19.7	7.22	61.0	44.1
	<i>Juncus sp.</i>	Tige	16.2	18.3	17.7	26.4	28.2	101	73.7
		Racine	15.5	16.1	16.5	21.8	21.1	36.3	49.3
	<i>Lavandula dentata</i>	Feuille	12.6	15.4	17.7	30.7	24.0	84.0	52.3
		Tige	25.8	20.7	35.0	36.7	46.7	125	119
		Racine	17.4	18.2	21.4	17.9	24.5	108	52.3

2.2.4. ÉVALUATION DE L'EFFET DE MATRICE

Comme décrit précédemment dans la bibliographie [193]. L'effet de matrice lors de l'utilisation de la source d'électrospray est très fréquent dans le cas de matrices complexes telles que celles de cette thèse et provoque des effets indésirables sur l'ionisation, il est donc normal de recourir à un étalonnage interne (étalonnage par matrice). L'effet de matrice a été évalué en comparant les pentes des lignes droites obtenues par étalonnage externe à partir d'étalons préparés dans le solvant par dilution de la solution mère concentrée et l'étalonnage matriciel pour chaque partie de la plante analysée (racine, tige et feuille) et chaque type de matrice végétale étudié. Un effet de matrice (ME) en pourcentage a été calculé à partir de l'expression:

$$ME(\%) = \left[\frac{S_m}{S_e} - 1 \right] \times 100$$

S_m : pente de la ligne obtenue dans la matrice.

S_e : pente de la ligne d'étalonnage externe.

Considérant que des valeurs égales à zéro impliquent l'absence d'effet de matrice, des valeurs supérieures à zéro impliquent une amélioration de l'ionisation et des valeurs inférieures à zéro impliquent une suppression de l'ionisation. Plus précisément, les valeurs inférieures à 20 % étaient considérées comme un effet de matrice faible, les valeurs comprises entre 20 et 40 % comme un effet de matrice moyen, tandis que les valeurs comprises entre 40 et 60 % étaient considérées comme un effet de matrice élevé, les valeurs supérieures à 60 % comme un effet de matrice très élevé.

La figure 31 montre les pourcentages d'effet de matrice obtenus dans l'analyse des différentes parties des plantes analysées. Comme on peut l'apprécier, l'ENR et le CPR sont les composés qui souffrent en général d'un grand effet de matrice, mais le plus grand effet de matrice est présenté par l'IBU dans *Juncus sp.* Le FMQ est le composé qui présente le moins d'effet de matrice, environ 30 % en *Salicornia eu.* matrice et environ 10 % pour le reste des matrices des plantes. L'existence d'un effet de matrice a donc forcé l'utilisation d'une procédure de calibration matricielle pour l'analyse quantitative des composés étudiés.

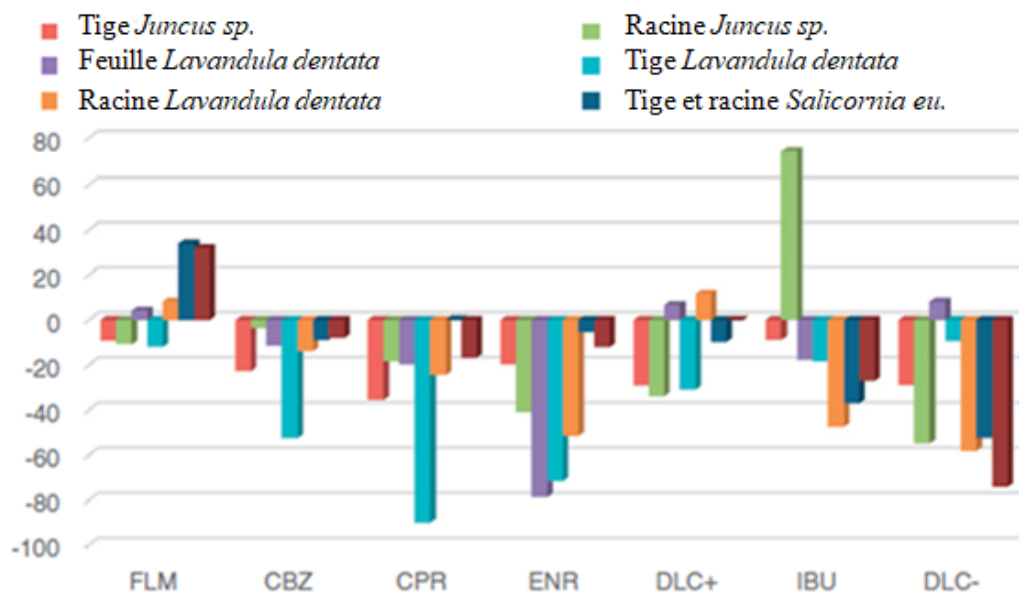


Figure 32. Représentation graphique des pourcentages de l'effet de matrice (ME) dans les différentes matrices végétales étudiées.

2.2.5. PRÉCISION: TESTS DE RÉCUPÉRATION

La précision d'une méthode analytique marque la proximité d'un résultat par rapport à la valeur considérée comme réelle. Il existe plusieurs procédures pour évaluer l'exactitude:

- Application de la méthode à un matériau de référence certifié (CRM).
- Comparaison des résultats avec une méthode standard.
- Essais de récupération par fortification des échantillons.

Puisqu'il n'y a pas de matériaux de référence contenant les analytes dans nos matrices, ni de méthodes standard dans ce cas, des tests de récupération ont été utilisés sur des échantillons fortifiés selon la procédure décrite dans la section 2. Les pourcentages de récupération ont été calculés à partir de pourcentages triplés en pourcentage du composé extrait, à deux niveaux de concentration, faible ($50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le mode ESI+ et $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le mode ESI-) et élevé ($500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

Les tableaux 9 et 10 montrent les résultats obtenus, comme on peut l'observer, en général les taux de récupération se situent entre 60 et 107 %, soulignant les taux de récupération élevés obtenus pour le CBZ dans toutes les matrices évaluées, en général les taux de récupération de l'ENR et du CPR étaient d'environ 70 %, ceci est conforme aux résultats obtenus précédemment par les autres auteurs Hu et al. [194] pour les matrices végétales, l'IBU montre un taux de récupération

de 70 % pour la plupart des matrices et le DCL entre 80 et 90 % pour les matrices de récupération des DCL.

La FMQ était le principe actif qui montrait le plus de dépendance avec la matrice, puisque les résultats obtenus pour la tige se situaient dans tous les cas entre 90 et 100 %, néanmoins de faibles récupérations ont été obtenues, autour de 60 %, dans la racine de la *Salicornia eu.* et *Lavandula dentata*.

Tableau 9. Récupération obtenue pour FMQ, CBZ et CPR dans les différentes matrices végétales.

	Matrice	FMQ		CBZ		CPR	
		50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹
<i>Salicornia europaea</i>	Tige	100 ± 15	105 ± 10	100.9 ± 7.6	90.3 ± 5.7	75.7 ± 2.8	69.2 ± 5.6
	Racine	67.1 ± 6.4	87.1 ± 10	66.5 ± 0.6	67.1 ± 6.5	75.7 ± 0.2	73.2 ± 6.5
<i>Juncus sp.</i>	Tige	89.6 ± 8.4	77.3 ± 9.0	99.5 ± 1.3	89.9 ± 9.4	72.1 ± 0.5	65.3 ± 7.9
	Racine	97.7 ± 5.5	87.6 ± 5.9	100 ± 8.7	97.7 ± 3.4	71.2 ± 3.6	81.6 ± 7.3
<i>Lavandula dentata</i>	Feuille	100 ± 8.9	90.1 ± 11	88.4 ± 5.4	90.6 ± 9.9	70.4 ± 2.2	77.0 ± 8.4
	Tige	87.8 ± 7.8	97.8 ± 12	77.5 ± 0.2	77.8 ± 7.2	78.2 ± 2.3	82.3 ± 4.9
	Racine	60.1 ± 2.2	70.3 ± 5.2	107 ± 8.9	80.1 ± 6.2	72.5 ± 0.3	66.8 ± 2.6

Tableau 10. Récupération obtenue pour ENR, DCL et IBU dans les différentes matrices végétales.

	Matrice	ENR		DCL		IBU	
		50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	50 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹	150 ng·g ⁻¹	500 ng·g ⁻¹
<i>Salicornia europaea</i>	Tige	62.5 ± 1.5	71.2 ± 3.6	95.6 ± 3.4	99.8 ± 2.4	75.2 ± 19	69.8 ± 7.6
	Racine	74.1 ± 0.2	75.6 ± 6.9	61.5 ± 3.8	89.2 ± 7.6	82.7 ± 1.1	75.4 ± 4.6
<i>Juncus sp.</i>	Tige	72.1 ± 0.1	75.0 ± 5.0	101 ± 13	95.1 ± 5.1	69.3 ± 9.4	74.1 ± 7.7
	Racine	74.5 ± 0.6	78.5 ± 6.4	78.1 ± 1.6	88.8 ± 2.9	65.7 ± 1.1	70.0 ± 6.6
<i>Lavandula dentata</i>	Feuille	71.2 ± 5.2	71.3 ± 4.3	100. ± 6.8	89.7 ± 9.6	81.9 ± 5.1	67.9 ± 2.3
	Tige	78.3 ± 8.4	77.9 ± 2.3	68.9 ± 3.4	96.3 ± 6.9	70.5 ± 1.5	70.7 ± 4.8
	Racine	66.9 ± 0.8	74.1 ± 9.3	72.1 ± 1.1	92.8 ± 12	79.4 ± 5.6	73.2 ± 0.9

3. ESSAIS D'EXPOSITION

3.1. ESSAIS D'EXPOSITION: *LAVANDULA DENTATA*

Huit plantes de *Lavandula dentata* ont été utilisées pour les essais d'exposition, de 30 à 40 cm de haut, qui ont été divisés en deux groupes : six plantes pour le test d'exposition et deux plantes en tant que groupe témoin.

Les plantes du groupe exposé ont été irriguées en double avec des solutions aqueuses contenant les analytes à différentes concentrations ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $700 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les plantes ont été irriguées tous les deux ou trois jours (selon l'humidité du substrat) avec 20 mL de ces solutions, pour un total de 30 jours. Les deux plantes du groupe témoin ont été irriguées pendant la même période et avec le même volume d'eau sans analytes.

Tous les 7 jours, soit l'équivalent de trois arrosages, des coupes étaient effectuées dans chaque plante, coupant à la fois la tige et les feuilles, et chaque type d'échantillon était soumis à la procédure d'extraction proposée. L'échantillon correspondant à la racine n'a été prélevé, pour des raisons évidentes, qu'à la fin de l'essai, en prélevant également un échantillon du substrat. La figure 33 montre le schéma des tests d'exposition.

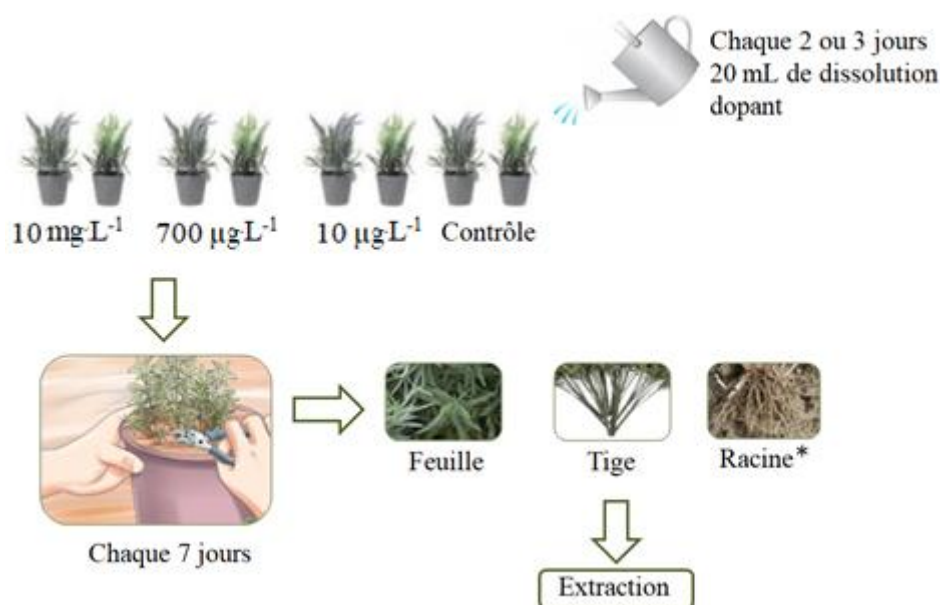


Figure 33. Schéma du test exposure avec *Lavandula dentata*.

(* La racine a été extraite à la fin de l'essai).

Après sept jours, c'est-à-dire à la quatrième dose, les plantes qui étaient sous irrigation avec de fortes concentrations ont commencé à acquérir une légère couleur jaune, tandis que les autres plantes de l'essai, ainsi que les contrôles, n'ont subi aucun changement visuel, maintenant l'odeur caractéristique de lavande.

Au cours de la deuxième semaine, non seulement les plantes soumises à de fortes concentrations se sont considérablement détériorées, mais les plantes exposées à une concentration de dilution intermédiaire ($700 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) ont également commencé à perdre l'odeur de lavande.

A la fin de la troisième semaine, les plantes dopées à forte concentration étaient pratiquement sèches (toute la plante grise), avec les tiges à l'envers. Les plantes qui ont reçu une concentration de dilution intermédiaire ont subi un changement très radical avec une apparence semblable à celle des plantes exposées à de fortes concentrations. Ceux qui ont été exposés à de faibles concentrations ont commencé à avoir des feuilles à l'envers, mais en conservant l'odeur de la lavande.

Au cours de la quatrième semaine, seules les plantes soumises à de faibles concentrations se sont détériorées davantage, tandis que le reste des plantes n'ont pas montré de dégradation supplémentaire. Tout au long de l'essai, le groupe témoin, irrigué avec de l'eau normale, a conservé son aspect normal tout en conservant l'odeur de lavande.

3.2. ESSAIS D'EXPOSITION: *JUNCUS SP.*

Comme dans l'essai de *Lavandula dentata*, sur un total de huit plantes, deux groupes ont été divisés, les plantes testées pour l'exposition et les plantes témoins.

Pendant la première semaine, toutes les plantes ont été arrosées avec 20 mL d'eau chaque jour, car *Juncus sp.* est une plante qui a constamment besoin d'un substrat humide. Cependant, ce volume n'était pas suffisant pour une plante qui a besoin d'avoir des conditions d'humidité optimales dans le substrat, car le substrat était parfois sec. Après sept jours, la première coupe des tiges a été faite (car la plante n'avait pas de feuilles).

La semaine suivante, le volume d'irrigation a été augmenté (50 mL) car une légère sécheresse a été observée dans le substrat pendant la première semaine d'irrigation. Au cours de cette semaine, on a observé que les plantes soumises à de fortes concentrations d'analytes ont commencé à acquérir une couleur jaune pâle, tandis que les autres n'ont pas connu de changement visuellement perceptible.

Au cours de la troisième et de la quatrième semaine, un volume de 50 mL a continué d'être administré à toutes les plantes chaque jour, et les tiges correspondantes ont été coupées à la fin de chaque semaine, coupant environ trois à cinq tiges de chaque plante.

Au cours de la troisième semaine, les plantes exposées à une concentration intermédiaire de dissolution dopante ont commencé à perdre leur couleur vert vif caractéristique, tandis que les deux plantes exposées à de fortes concentrations ont perdu leur rigidité, leur flexion, c'est-à-dire qu'elles ont commencé à se flétrir, tandis que les plantes soumises à de faibles concentrations, ainsi que les blancs n'ont subi aucun changement pendant cette semaine.

Au cours de la quatrième et dernière semaine d'essai, les plantes exposées à des concentrations élevées et intermédiaires ont complètement disparu et les plantes exposées à de faibles concentrations ont commencé à montrer des changements évidents dans leur détérioration, acquérant une couleur verte opaque. Les plantes contrôles n'ont montré aucun changement tout au long de l'essai.

À la fin de l'essai, la racine de la plante a été analysée et une partie du substrat a été conservée pour analyse ultérieure.

3.3. ESSAIS D'EXPOSITION: *SALICORNIA EUROPAEA*

Dans le cas de l'essai d'exposition à la *Salicornia europaea*, 10 plantes de *Salicornia europaea*, cultivées dans du sable de coco, dans des plateaux cellulaires en polystyrène de 5 x 5 cm et environ 2 plantes par cm² ont été utilisées. Ces plantes ont été acquises à AGRO-ON (Faro, Portugal).

Dans ce cas, pour maintenir le même mode d'essai que dans *Lavandula dentata* et *Juncus sp.* deux plantes ont été sélectionnées à chaque concentration, en utilisant les plantes restantes comme cibles (quatre plantes).

Les plantes ont été irriguées avec 10 mL de solutions aqueuses contenant les analytes à différentes concentrations (10 mg·L⁻¹, 700 µg·L⁻¹ et 10 µg·L⁻¹) tous les deux ou trois jours, arrosant les témoins uniquement avec de l'eau.

Comme dans le cas des *Juncus sp.* n'ayant pas de feuilles de cette plante, ont été coupées entre 4 et 5 tiges de chaque plante après chaque semaine d'essai, au cours de la première semaine, les plantes à fortes concentrations ont connu un grand changement, perdant la rigidité dans les tiges

et acquérant une couleur grisâtre, les plantes exposées à faibles et intermédiaires concentrations ont perdu la couleur verte et charnues dans les tiges.

Au cours de la deuxième semaine, les plantes exposées à de fortes concentrations se sont considérablement détériorées, toutes les tiges étaient à l'envers et presque toute la plante était fanée, mais les plantes à concentrations intermédiaires et faibles n'ont pas changé par rapport à la semaine précédente. Dans le cas des blancs, elles sont restées inchangées.

Au cours de la troisième semaine, les plantes exposées à de fortes concentrations étaient complètement mortes, tandis que le reste des plantes exposées s'aggravait encore, de sorte que l'essai a été terminé cette semaine-là et que la quatrième semaine d'essais d'exposition n'a pu être effectuée. Les installations de contrôle sont restées inchangées.

Comme pour les plantes précédentes, la racine a été analysée en dernier lieu, après toutes les tiges et après avoir terminé l'essai, dans ce cas un échantillon de substrat n'a pas été prélevé, car étant cultivé dans du sable de coco, il ne peut être utilisé pour les analyses ultérieures.

Comme pour les plantes précédentes, la racine a été analysée en dernière instance, une fois l'essai terminé.

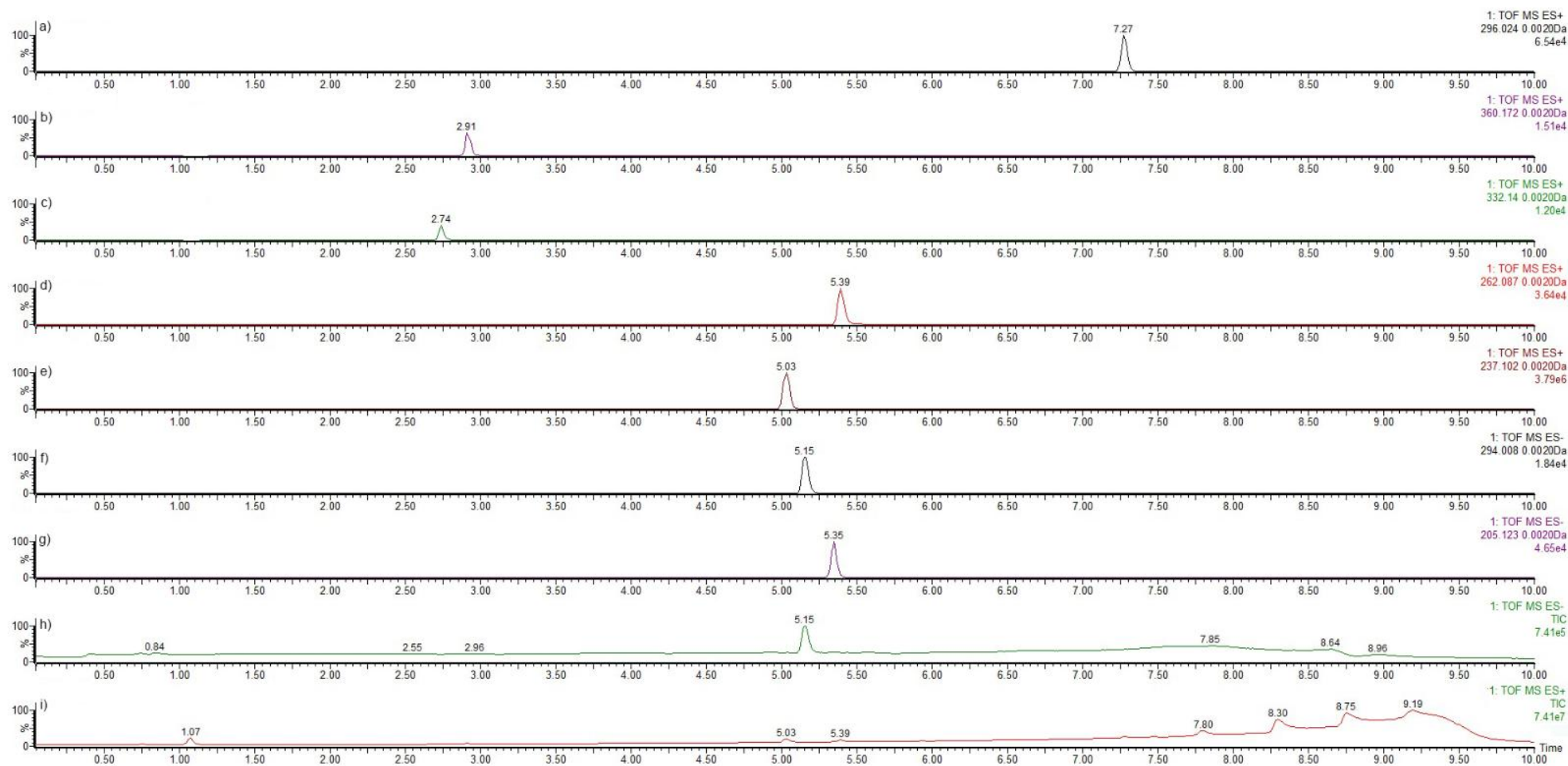


Figure 34. Chromatogrammes ioniques totaux (TIC) et extraits d'un échantillon de tige de *Juncus sp.* avec tous les analytes à $25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. a) Diclofénac- ; b) Enrofloxacin+ ; c) Ciprofloxacin+ ; d) Fluméquine+ ; e) Carbamazépine+ ; f) Diclofénac+ ; g) Ibuprofène- ; h) Chromatogramme par ionisation totale négative ; i) Chromatogramme par ionisation positive.

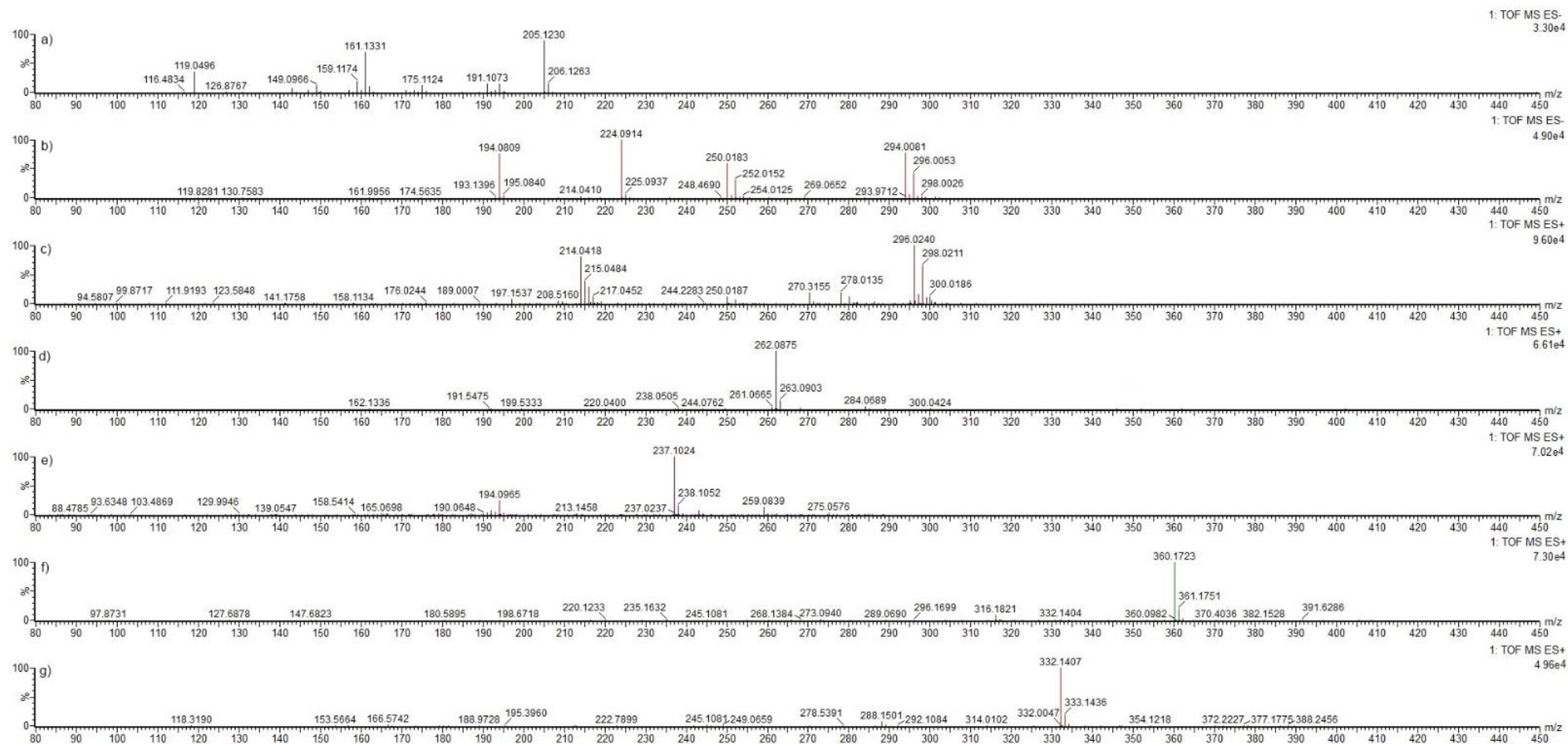
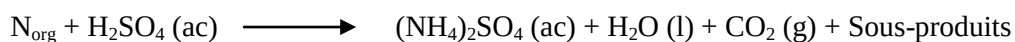


Figure 35. Spectre de masse d'un échantillon de tige *Juncus sp.* avec tous les analytes à $25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. a) Ibuprofène- b) Diclofénac- ; c) Diclofénac+; d) Fluméquine+; e) Carbamazépine+ ; f) Enrofloxacin+ ; g) Ciprofloxacin+.

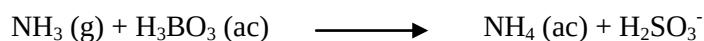
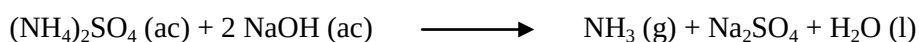
4. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE DES SUBSTRATS

La méthode Kjeldahl a été utilisée pour déterminer la teneur totale en azote organique et minéral d'échantillons de substrat provenant de plantes soumises aux essais d'exposition *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia eu.* Cette méthode consiste en la digestion humide de l'échantillon et le titrage acido-basique, selon la méthode décrite par Moreno Ramón H., Ibáñez Asensio S. [195]. Les substrats des différentes matrices végétales ont été analysés en double en prélevant 1 g de chaque échantillon de substrat de chaque essai à différentes concentrations d'analyte.

L'échantillon de sol est digéré avec du H_2SO_4 et un mélange catalytique à haute température pour transformer la matière organique de l'échantillon en dioxyde de carbone et en eau. Les groupes amine ou amide sont quantitativement transformés en ion ammonium, tandis que l'azote dans un état d'oxydation plus élevé (nitrates, nitrites ou groupes nitro, azo ou azoxi) est transformé dans le processus de digestion en azote élémentaire ou ses oxydes qui ne sont pas retenus dans le récipient collecteur [195].



Après alcalinisation de l'échantillon, l'ammoniac obtenu est distillé, condensé et recueilli dans une solution d'acide borique et titré avec de l'acide sulfurique pour déterminer la teneur totale en azote, jusqu'à ce que l'indicateur Shiro-Tashiro (bleu méthylène et rouge méthyle) passe du vert initial au violet [195,196].



5. OBTENTION DE MÉTABOLITES

Le logiciel MetaboLynxTM XS Training MassLynx 4.1 a été utilisé pour identifier les métabolites et les produits de dégradation possibles obtenus lors de l'exposition des trois matrices végétales à des solutions aqueuses contenant les analytes à différentes concentrations.

Grâce à ce logiciel, il est possible de détecter rapidement un grand nombre d'analytes possibles dans la matrice, avec un haut degré de sensibilité et de résolution. Il permet d'interpréter et de convertir les données en informations significatives, avec la création de petits profils moléculaires identifiant ainsi les métabolites possibles ainsi que les voies métaboliques et les formules moléculaires correspondantes [197, 198].

Metaboliynx permet la détection et l'identification de composés xénobiotiques pour l'étude du métabolisme des médicaments *in vitro* et *in vivo*, en détectant les biotransformations sans nécessiter de prédictions métaboliques, en comparant chaque échantillon métabolisé avec un échantillon témoin (parent) qui obtient les métabolites attendus. Il est également possible d'effectuer la recherche inattendue de métabolites en l'absence d'un contrôle [198].

Les échantillons analysés par UPLC-Q-TOF-MS, sont traités par le logiciel qui utilise un algorithme qui permet la comparaison des données des analytes avec celles de l'échantillon de contrôle en fixant les pics liés à la matrice, évitant la production d'une liste ingérable de faux pics positifs de métabolites ou des affectations incorrectes. Cet algorithme évalue les différentes structures du spectre ionique des fragments de drogues pour évaluer et identifier automatiquement les fragments sur la base d'une série d'algorithmes chimiquement intelligents basés sur les déconnexions systématiques et réalisables de la structure précurseur [198].

Le tableau 11 montre les voies métaboliques choisies pour le traitement des échantillons obtenus après les essais d'exposition. La sélection des voies métaboliques a été faite sur la base d'informations bibliographiques prenant en compte les plus probables pour le type de matrices et de composés sélectionnés dans cette thèse.

Tableau 11. Voies métaboliques et augmentation massive des métabolites attendus.

Voie métabolique	Formule	Masse (mDa)
Reduction	+H ₂	+2.0157
Hydroxylation	+O	+15.9949
Hydratation	+H ₂ O	+18.0106
Sodiado	+Na	+22.9898
2 x Hydroxylation	+O ₂	+31.9898
Acetylation	+C ₂ H ₂ O	+31.9898
Demethylation	-CH ₂	-14.0157
Alcohols dehydration	-H ₂ O	-18.0106
Deethylation	-C ₂ H ₄	-28.0313
Hydroxymethylene loss	-CH ₂ O	-30.0106

6. EXTRACTION DE PLANTES POUR TESTS ENZYMATIQUES

Une collection de 150 plantes a été collectée dans le PND et les régions avoisinantes, sur lesquelles ont été effectués les différents ensembles d'essais enzymatiques décrits dans le présent rapport (section 8). Les échantillons ont été broyés à l'aide d'un broyeur, congelés pendant au moins trois heures, puis lyophilisés et conservés dans un congélateur (-80°C) jusqu'à leur extraction pour analyse.

Aux fractions de 100 mg de matière sèche de chaque plante, on a ajouté 50 mL de chacun des solvants suivants : hexane, éthanol, eau : éthanol (1:1, v/v) et acétate d'éthyle. Après les avoir conservés pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons, ils ont été filtrés à travers du papier filtre et le solvant s'est évaporé à sec. Chaque résidu a été dilué avec du diméthylsulfoxyde (DMSO), maintenu pendant 10 minutes dans un bain ultrasonique et agité en vortex pour assurer l'homogénéisation de la solution. Chaque échantillon a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 6000 $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$. Enfin, la solution dans le DMSO a été de nouveau diluée à une concentration finale d'ependoff de 3.433 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, de manière à obtenir une concentration de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de chaque échantillon dans le puits des plaques utilisées.

7. OPTIMISATION DES CONDITIONS ENZYMATIQUES POUR LE TEST DE LA TYROSINASE

Pour déterminer les conditions dans lesquelles l'activité enzymatique de la tyrosinase est optimale, différents tests ont été effectués, modifiant les variables pH, concentration enzymatique et concentration du substrat. Détermination de l'activité de la tyrosinase par spectrophotométrie.

Dans les dosages enzymatiques des enzymes restantes, la collagénase, la lipoxgénase et l'élastase, des protocoles précédemment optimisés par le groupe de recherche; molécules bioactives de l'Institut de Chimie de Nice, Stierlin E. et al. [199], ont été utilisés, selon les méthodes expérimentales décrites dans le présent rapport.

Dans ces essais, l'enzyme tyrosinase champignonnière a été utilisée, car elle présente de nombreuses similitudes structurelles avec l'enzyme tyrosinase mammifère, qui est rarement utilisée, car elle est très coûteuse [144]. L'affinité des inhibiteurs pour l'enzyme mammifère est généralement plus faible que lors de l'utilisation de l'enzyme champignon, ce qui entraîne des "faux positifs", par exemple des extraits individuels ou des molécules qui inhibent la tyrosinase du champignon, mais qui sont inefficaces dans la tyrosinase mammalienne. Par conséquent, certaines

études récentes ont commencé à utiliser des extraits bruts de mélanocytes humains comme source d'enzymes [144].

Dans tous les tests enzymatiques, différents inhibiteurs standard ou témoins positifs bien connus comme inhibiteurs de cette enzyme ont été utilisés. De plus, le DMSO a été utilisé comme témoin négatif, ce qui a permis de déterminer le pourcentage d'inhibition de chaque enzyme [144].

Selon les données disponibles dans la bibliographie, le moyen pour que l'enzyme agisse correctement doit être dans un tampon phosphate à un pH entre 6 et 8 [199].

La figure 36 montre l'évolution de l'activité enzymatique de la tyrosinase en fonction du pH du tampon phosphate utilisé.

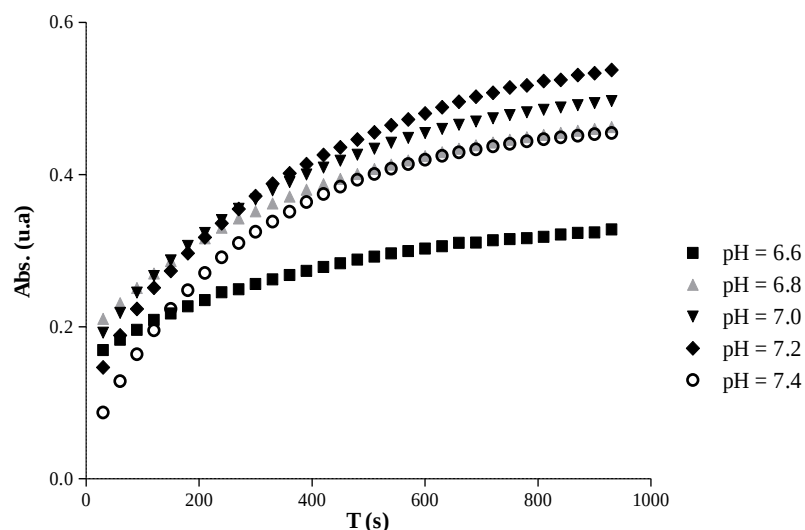


Figure 36. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction du pH.

Au vu des résultats, la courbe la plus sigmoïde présentant une plus grande stabilité à température ambiante correspond à un pH de 6.8, ce qui est le plus largement utilisé dans les essais réalisés avec l'enzyme tyrosinase [201, 202, 203]. Par conséquent, un tampon phosphate de pH 6.8 a été choisi pour les essais avec cette enzyme.

Les échantillons et les contrôles ont été mesurés dans les mêmes conditions, en ajoutant dans le puits : 150 μL d'enzyme diluée dans un tampon phosphate à pH 6.8, 7.5 μL de DMSO et 100 μL de substrat. Il est conclu que la meilleure courbe enzymatique est obtenue avec une concentration enzymatique de 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ puisqu'elle fournit une courbe sigmoïde pour un suivi adéquat de l'évolution de la réaction enzymatique (figure 37).

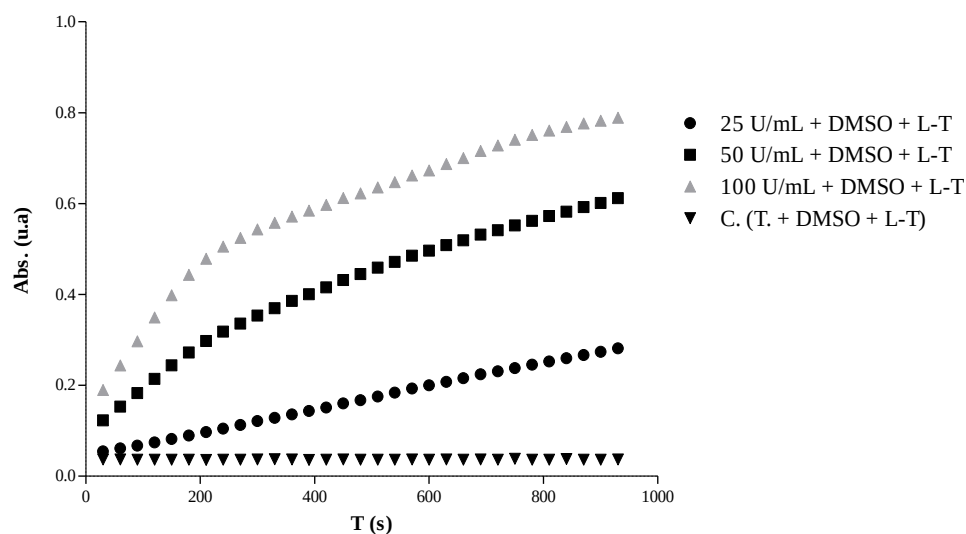


Figure 37. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction de la concentration enzymatique.

Par conséquent, pour effectuer le test enzymatique de l'enzyme tyrosinase, on a utilisé un tampon phosphate à pH 6.8 et une concentration enzymatique de $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans le puits de la plaque.

Pour déterminer la concentration optimale du substrat, différents tests ont été effectués en faisant varier la concentration du substrat (0.5, 1, 1.5 et 2 mM), qui est équivalente aux concentrations finales dans le puits de 0.194, 0.388, 0.582 et 0.776 mM, respectivement, avec une concentration enzymatique de $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans 50 mM de tampon phosphate à pH 6.8. Comme on peut l'observer sur la figure 38, la concentration du substrat 1 mM est celle qui présente une cinétique plus régulière et une courbe plus sigmoïde en augmentant le temps de la réaction enzymatique, complétant dans sa totalité la réaction enzymatique contrairement à la concentration de 1.5 mM dont la ligne de tendance commence à perdre la courbure ce qui ne permet pas que la réaction soit terminée.

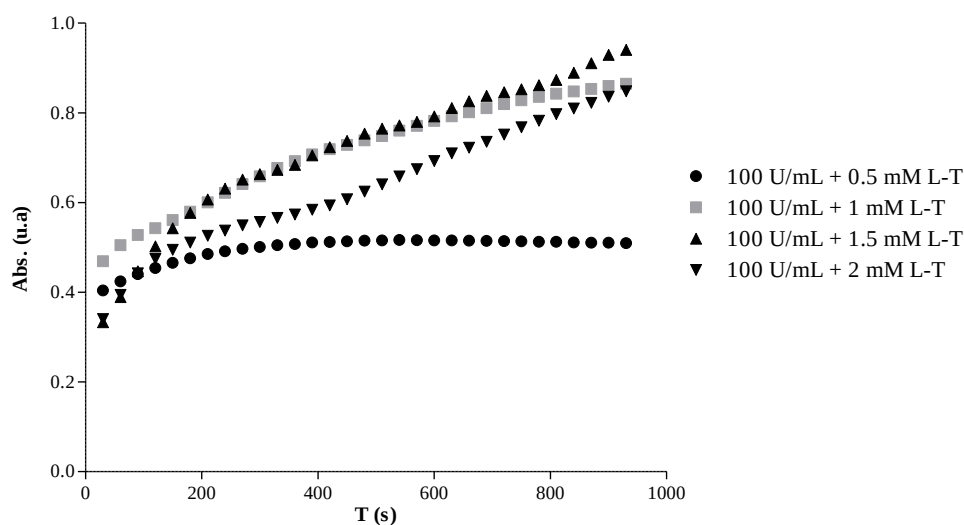


Figure 38. Activité enzymatique de la tyrosinase en fonction de la concentration du substrat.

L'acide kojique a été utilisé comme inhibiteur de référence parce que, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, il présente une inhibition compétitive en présence de L-Tyrosine et non compétitif avec le substrat L-DOPA, tandis que l'inhibiteur de l'arbutine inhibe la tyrosinase en forme compétitif.

Nous utiliserons l'acide kojique comme inhibiteur de référence puisque, tel que mentionné ci-dessus, il présente une inhibition compétitive en présence de L-Tyrosine et n'est pas compétitif avec le substrat L-DOPA, alors que l'inhibiteur d'arbutine inhibe la tyrosinase en compétition.

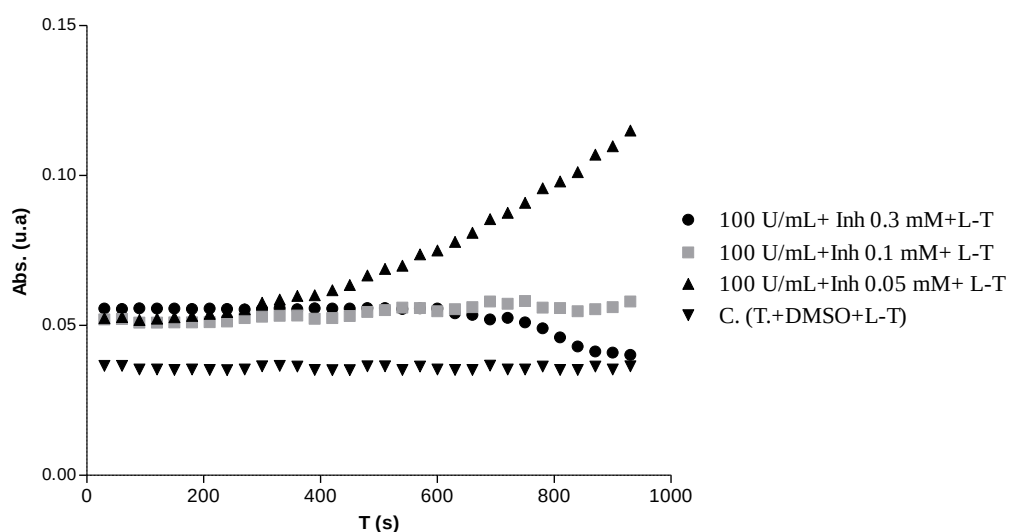


Figure 39. Progrès de la réaction enzymatique de l'acide kojique avec la tyrosinase en fonction de sa concentration, en utilisant la L-Tyrosine comme substrat.

Au vu des résultats, on peut dire que la meilleure concentration d'inhibiteur est de 3.43 mM d'acide kojique (0.1 mM dans le puits) avec une concentration de substrat L-Tyrosine de 1 mM, soit 0.388 mM dans le puits, car la courbe de réaction est parallèle à celle du contrôle, indiquant qu'aucune activité enzymatique ne se manifeste. Ceci est conforme à la littérature révisée puisque l'acide kojique inhibe l'enzyme de façon compétitive en présence de L-Tyrosine [144, 205].

8. PROTOCOLES POUR LES TESTS ENZYMATIQUES

8.1. ENZYME COLLAGÉNASE

Pour le dosage de l'enzyme collagénase, 150 μL de cette enzyme diluée dans une solution tampon tricine à pH 7.5 ont été automatiquement ajoutés à une plaque de 96 puits (Nunc 96 F. Non traité), suivis de 7.5 μL d'échantillon ou d'inhibiteur standard ou cosmétique ($3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), ou DMSO en triple exemplaire, afin que la concentration finale dans chaque puits de collagénase soit $31 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

L'inhibiteur standard utilisé est l'acide tannique et comme inhibiteur cosmétique un extrait de la plante de réglisse a été utilisé, connu pour son activité inhibitrice et largement utilisé par le groupe de recherche ; Molécules bioactives de l'Institut de chimie de Nice dans leurs essais enzymatiques.

Ensuite, 157.5 μL de tampon de tricine à pH 7.5 et 7.5 μL de DMSO ont été ajoutés manuellement aux quatre derniers puits de la plaque (des puits numéro 93 à 96), qui sont les puits de contrôle dans ce test enzymatique.

La plaque enzymatique a été incubée pendant 15 minutes sous agitation, après quoi une lecture d'absorbance de la plaque a été effectuée dans le spectrophotomètre à 345 nm, cette lecture étant la cible de notre signal. Une fois le signal cible déterminé, 100 μL de substrat FALGPA 2 mM ont été automatiquement ajoutés dans chaque puits. Enfin, la plaque enzymatique a été incubée pendant 30 minutes après 2 minutes d'agitation, afin que la réaction enzymatique ait lieu et que le substrat rejoigne l'enzyme; après ce temps, la plaque a été lue à 345 nm pour déterminer le signal correspondant à l'échantillon.

8.2. ENZYME TYROSINASE

Dans le cas de l'enzyme tyrosinase, une plaque de 96 puits (Nunc. 96 F Non traité) a été utilisée de la même manière que dans la section précédente et 150 μL d'enzyme ont été ajoutés automatiquement, obtenant une concentration finale d'enzyme tyrosinase de $100\,433\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le puits, puis en triple exemplaire, 7.5 μL de standard, DMSO ou échantillon. Dans les derniers puits, 157.5 μL de pH 6.8 et de tampon phosphate DMSO ont été ajoutés automatiquement, tous les puits ayant le même volume. L'inhibiteur cosmétique était le même que celui utilisé dans l'enzyme collagénase, tandis que l'acide kojique était utilisé comme inhibiteur standard, comme mentionné ci-dessus, c'est un bon inhibiteur de cette activité enzymatique [144].

Ensuite, la plaque a été incubée pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière, après une brève agitation de celle-ci, après quoi la lecture de la plaque dans le spectrophotomètre à 480 nm, longueur d'onde caractéristique de l'enzyme tyrosinase, a été effectuée, obtenant ainsi la valeur cible du test enzymatique.

Comme dans le cas précédent, 100 μL de substrat L-DOPA ou L-Tyrosine ont été ajoutés dans chaque puits, ce qui a permis d'obtenir une concentration de substrat de 0.388 mM dans chaque puits et d'incuber, après 2 minutes d'agitation, la plaque couverte d'un film dans l'obscurité pendant 20 minutes. Après ce temps, la plaque a été lue à 480 nm pour obtenir le signal d'échantillonnage.

L'acide kojique a été utilisé comme inhibiteur standard ou contrôle positif parce qu'il est largement utilisé comme inhibiteur de l'enzyme tyrosinase,

La figure 40 montre le schéma de distribution des plaques enzymatiques pour les dosages des enzymes collagénase et tyrosinase. Où E correspond aux échantillons analysés, tous en triple exemplaire, R l'inhibiteur cosmétique utilisé dans les deux cas appartenant à l'extrait végétal de réglisse, A sont les différents acides utilisés comme inhibiteurs standard dans les différents tests et T est la solution tampon utilisée dans chaque test.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		E 1			E 2			E 3			E 4	
B		E 5			E 6			E 7			E 8	
C		E 9			E 10			E 11			E12	
D		E 13			E 14			E 15			E 16	
E		E 17			E 18			E 19			E 20	
F		E 21			E 22			E 23			E 24	
G		E 25			E 26			E 27			E 28	
H		E 29			R.		A.		DMSO		T.	

Figure 40. Plan de la plaque de l'enzyme collagénase et de l'enzyme tyrosinase.

8.3. ENZYME ÉLASTASE

Dans une plaque de 96 puits (Nunc 96 F. Non traité), 150 μ L d'enzyme, 7.5 μ L d'échantillon, de standard de standard cosmétique ou de DMSO ont été automatiquement ajoutés à chaque puits en triple exemplaire. Dans les deux derniers puits, 157.5 μ L de tampon tris ont été ajoutés. La plaque a ensuite été agitée pendant 2 minutes et incubée pendant 20 minutes, pour finalement lire la plaque à 410 nm afin d'obtenir le blanc du test enzymatique.

Pour terminer la réaction enzymatique, 100 μ L de substrat AAAPnA 2.06 mM (0.8 mM final dans le puits) dissous dans un tampon pH 8 tris ont été ajoutés à chaque puits ; après deux minutes d'agitation, une incubation de 40 minutes et une lecture à 410 nm ont été effectuées pour obtenir le signal échantillon.

La quercétine a été utilisée comme inhibiteur standard et un extrait de framboise HydraBerry (fruits rouges) extrait par le groupe de recherche a été utilisé comme inhibiteur cosmétique car il contient une forte teneur en flavonoïdes, comme le montre la bibliographie [199] la forte activité inhibitrice des flavonoïdes sur l'élastase.

8.4. ENZYME LIPOXYGÉNASE

Pour le test enzymatique de l'enzyme lipoxigénase, contrairement aux autres tests enzymatiques, a été utilisée une plaque de 96 puits Costar UV transparent, une plaque qui n'absorbe pas dans le spectre ultraviolet (235 nm).

150 μL d'enzyme lipoxygénase ont été ajoutés automatiquement, obtenant une concentration finale dans le puits de $400 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ puis 7.5 μL d'échantillon ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ final dans le puits), standard ou DMSO, en triple exemplaire.

Comme lors des essais précédents, 157.5 μL de tampon phosphate à pH 8 ont été ajoutés manuellement dans les derniers puits à titre de contrôle, puis la plaque a été incubée pendant 10 minutes avec agitation constante et protégée de la lumière (en utilisant une feuille d'aluminium à cette fin). Après ce temps, la plaque a été lue à une longueur d'onde de 235 nm, obtenant ainsi la cible de l'essai enzymatique. Plus tard, 100 μL de la solution de substrat d'acide linoléique, ont été ajoutés automatiquement pour obtenir 0.388 mM de concentration finale dans le puits. Il a été procédé à secouer de 2 minutes à l'abri de la lumière et la lecture a été faite à 235 nm, obtenant ainsi le signal du blanc 2. Enfin, il a été procédé à l'incubation pendant 50 minutes à l'abri de la lumière et la lecture du signal d'échantillon a été faite à 235 nm.

La figure 41 montre la distribution de la plaque pour les dosages de l'élastase et de la lipoxygénase, comme dans le cas précédent, les échantillons (E) ont été analysés en trois exemplaires et les inhibiteurs et témoins ont été testés dans la dernière rangée de la plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		E 1			E 2			E 3			E 4	
B		E 5			E 6			E 7			E 8	
C		E 9			E 10			E 11			E 12	
D		E 13			E 14			E 15			E 16	
E		E 17			E 18			E 19			E 20	
F		E 21			E 22			E 23			E 24	
G		E 25			E 26			E 27			E 28	
H		E 29			R.		Q.		DMSO		T.	

Figure 41. Plaque plan de l'enzyme élastase et de l'enzyme lipoxygénase.

9. OPTIMISATION DES TESTS ANTIOXYDANTS

9.1. POLYPHÉNOLS

L'une des méthodes traditionnelles les plus couramment utilisées pour déterminer la teneur en polyphénols d'un échantillon est la méthode Folin-Ciocalteu (FC), qui est basée sur la capacité de réduction de ces substances. Dans ce rapport, la procédure décrite par Herald J.T. et al. [204] a été utilisée, qui consiste essentiellement à ajouter les échantillons ou l'étalon utilisé à 75 μL d'eau MilliQ sur une plaque de 96 puits, suivis de 25 μL du réactif FC, pour ajouter 100 μL d'une solution de Na_2CO_3 à 75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ après 6 minutes et mesure de l'absorbance à 765 nm.

La figure 42 montre une plaque de ce test, qui montre dans la partie supérieure gauche l'étalonnage effectué avec de l'acide gallique, effectué en trois exemplaires. Les échantillons ont également été mesurés en trois exemplaires, suivant le modèle de plaque décrit dans la partie expérimentale.

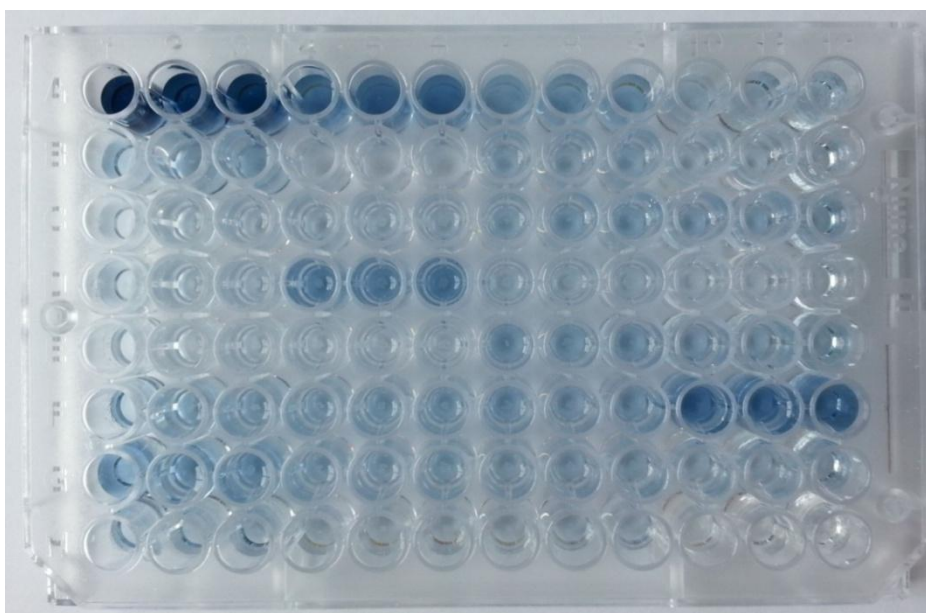


Figure 42. Exemple d'une plaque pour la détermination des polyphénols.

La teneur en polyphénols est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur bleue générée dans la réaction avec le réactif phosphomolybdate / phosphotungstate, dans la figure on observe que l'échantillon correspondant aux puits F10, F11 et F12 a une teneur élevée en polyphénols, car il présente une intensité plus élevée en bleu.

9.2. FLAVONOÏDES

Pour la détermination des flavonoïdes, la méthode proposée par Herald J.T. et al. [204] a été utilisée, avec de légères modifications concernant le volume des dissolutions utilisées et le réactif, avec quelques modifications, par exemple, au lieu de la catéchine (figure 44), la quercétine a été utilisée (figure 43) car la structure des deux molécules est très similaire et présente deux maximums d'absorption, l'un correspondant à 240-285 nm appartenant au groupe II et l'autre à 300-400 nm correspondant au groupe I [200]. La chélation avec l'aluminium modifie l'absorption de la bande I. On ajoute de l'acétate de potassium, nécessaire pour avoir un milieu basique et ce chélate est produit et la précipitation de l'aluminium est évitée, dans l' AlCl_3 .

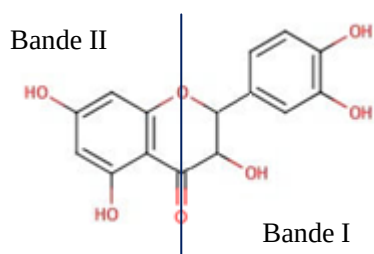


Figure 43. Formule structurale de la quercétine et de ses bandes d'absorption.

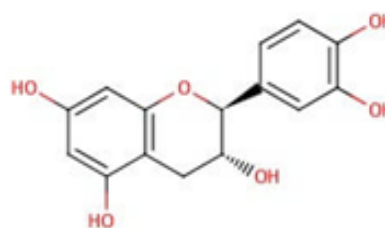


Figure 44. Formule structurale catequina.

Dans la figure 45, on peut voir comment dans les puits de la première rangée, l'étalonnage est en triple exemplaire. Le point le plus haut du calibrage correspond à une concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et se trouve dans les puits 1, 2 et 3. À première vue, on peut voir que l'échantillon en position D1, D2 et D3 a une teneur en flavonoïdes plus élevée que le reste, car il a une couleur légèrement verdâtre, similaire au calibrage.

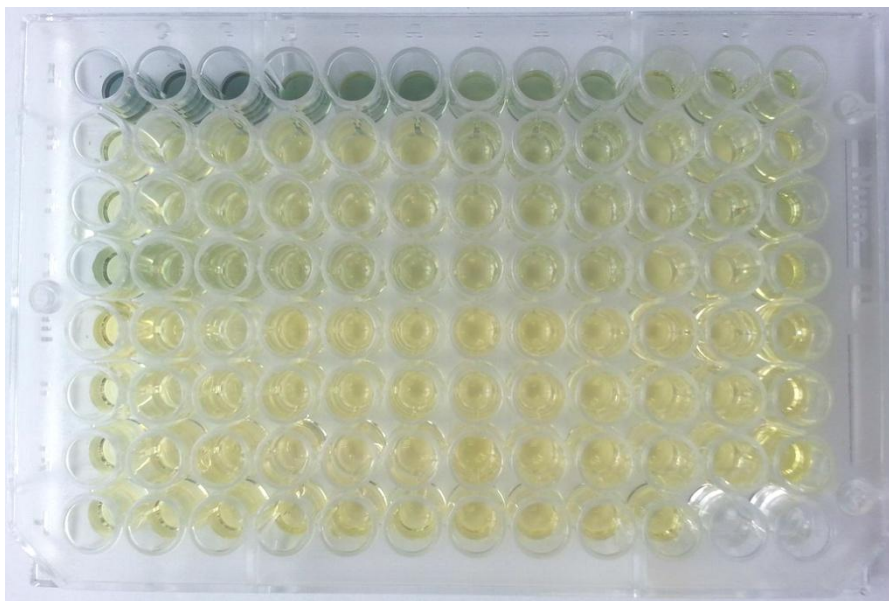


Figure 45. Exemple de plaque de flavonoïde.

10. PROTOCOLES POUR LES TEST D'ANTIOXYDANTS

10.1. FLAVONOÏDES

Sur une plaque transparente UV Costar de 96 puits, 50 μL d'eau et 50 μL de DMSO ont été ajoutés à chaque puits, suivis de 15 μL de DMSO ou d'une concentration d'échantillon de 3.433 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du DMSO (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentration finale dans les puits). La plage d'étalonnage standard de la quercétine hydratée a été réalisée en trois exemplaires dans les deux premières rangées de puits de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, à une concentration finale de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le puits.

Par la suite, 10 μL d'une solution d' AlCl_3 de 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 15 μL d'une solution de CH_3COOOK de concentration 1 M et 100 μL d'eau MilliQ ont été ajoutés. La plaque a ensuite été incubée pendant 40 minutes sans lumière, dans l'obscurité, et la plaque a été lue dans le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 415 nm.

La figure 46 montre le plan de la plaque dans le dosage des flavonoïdes, en effectuant un étalonnage descendant de la quercétine dans les premières rangées de la plaque transparente Costar UV et en testant chaque échantillon (E) et contrôle (DMSO) en trois exemplaires.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Standard 1 250 µg/mL			Standard 2 125 µg/mL			Standard 3 75 µg/mL			Standard 4 25 µg/mL	
B		Standard 5 5µg/mL			E 1			E 2			E 3	
C		E 4			E 5			E 6			E 7	
D		E 8			E 9			E 10			E 11	
E		E 12			E 13			E 14			E 15	
F		E 16			E 17			E 18			E 19	
G		E 20			E 21			E 22			E 23	
H		E 28			E 29			E 30			DMSO	

Figure 46. Plan de plaque des flavonoïdes.

10.2. POLYPHÉNOLS

Comme dans les cas précédents dans une plaque de 96 puits (Nunc 96 F. Non traité), 75 µL d'eau MilliQ ont été ajoutés à chaque puits, suivis de 15 µL de DMSO, d'un standard de calibration d'acide gallique ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou d'un échantillon à $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ final dans le puits) en DMSO. Une première lecture de la plaque a ensuite été faite à 765 nm, 25 µL de Folin-Ciocalteu /H₂O milliQ (1:1) de dissolution ont été ajoutés, et la plaque a été incubée pendant 6 minutes sous agitation en l'absence de lumière. Ensuite, on a ajouté 100 µL d'une solution de Na₂CO₃ de $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, on a recouvert la plaque recouverte d'un film et on l'a conservée dans un endroit sombre pendant 90 minutes, après quoi la dernière lecture de la plaque a été effectuée à 765 nm, obtenant avec cette dernière lecture la valeur de l'absorption des échantillons.

La figure 47 montre la distribution de la plaque utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols des échantillons analysés, E étant le numéro de l'échantillon, qui est introduit en trois exemplaires.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Standard 1 250 µg/mL			Standard 2 125 µg/mL			Standard 3 50 µg/mL			Standard 4 25 µg/mL	
B		Standard 5 5µg/mL			Standard 6 6.25 µg/mL			E 1			E 2	
C		E 3			E 4			E 5			E 6	
D		E 7			E 8			E 9			E 10	
E		E 11			E 12			E 13			E 14	
F		E 15			E 16			E 17			E 18	
G		E 19			E 20			E 21			E 22	
H		E 24			E 25			E 26			DMSO	

Figure 47. Plan de plaque des polyphénols.

10.3. DPPH

Pour le cas de la détermination des antioxydants par la méthode DPPH. Pour ce faire, 150 µL d'un mélange 50:50 (v/v) EtOH/acétate de tampon de pH 5.4 concentration 0.1 M ont été ajoutés automatiquement dans chaque puits d'une plaque à 96 puits (Nunc 96 F. Non traité).

Pour obtenir une concentration finale de l'échantillon dans chaque puits de 100 µg·mL⁻¹, on a ajouté 7.5 µL de chaque échantillon d'extrait de plante à une concentration de 3.433 mg·mL⁻¹, sauf dans les neuf derniers puits, où 7.5 µL de Trolox, DMSO ou le tampon 50:50 (v/v) EtOH/acétate pH 5.4 (0.1 M) a été ajouté.

Avant de lire la plaque à 517 nm, on l'a secouée pendant 2 minutes en l'absence de lumière. A la fin de la lecture de la plaque, 100 µL de solution de DPPH préparée dans 386.25 mM d'éthanol ont été ajoutés à tous les puits, obtenant ainsi une concentration finale du substrat de 150 µM dans chaque puits.

Après 2 minutes d'agitation dans l'obscurité, la deuxième lecture de la plaque a été effectuée à 517 nm, acquérant ainsi la valeur d'absorbance du second contrôle de la plaque. La plaque a ensuite été laissée dans un endroit sombre pendant 30 minutes pour que la réaction DPPH ait lieu, et une lecture finale a été effectuée à 517 nm, obtenant ainsi le signal de l'échantillon. La figure 48 montre le plan de la plaque dans l'essai DPPH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		M 1			M 2			M 3			M 4	
B		M 5			M 6			M 7			M 8	
C		M 9			M 10			M 11			M 12	
D		M 13			M 14			M 15			M 16	
E		M 17			M 18			M 19			M 20	
F		M 21			M 22			M 23			M 24	
G		M 25			M 26			M 27			M 28	
H		M 29			QT 40			Trolox			DMSO	

Figure 48. Plan de plaque de DPPH.

11. TRAITEMENT DES DONNÉES

Les données de lecture de l'absorbance ont été acquises avec le logiciel SoftMaxPro (Molecular Devices, Wokingham, Berkshire, Royaume-Uni) et les pourcentages d'inhibition des enzymes tyrosinase, élastase et lipoxigénase ainsi que l'activité antioxydante ont été calculés avec Prism (GraphPad Software, La Jolla ; California, États-Unis).

Comme les lectures ont été faites en trois exemplaires pour chaque échantillon, la moyenne a d'abord été faite avec son écart-type respectif, les valeurs obtenues ont été corrigées avec l'absorbance du DMSO, (contrôle des OD), selon la formule :

$$I\% = [(contrôle OD - échantillon OD) / contrôle OD] * 100$$

OD étant la densité optique.

Toutes les valeurs sont corrigées en mesurant la cible correspondant à l'absorbance de l'échantillon avant l'addition du substrat, c'est-à-dire la première lecture de la plaque.

Dans le cas des échantillons d'essai de collagénase enzymatique, la formule a été utilisée :

$$I\% = [échantillon OD / (blanc OD - contrôle OD)] * 100$$



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo, se analizarán, en primer lugar, los resultados obtenidos de los ensayos de exposición de las tres matrices vegetales seleccionadas evaluando las acumulaciones de los fármacos en las distintas partes de las plantas, así como la evolución de las mismas durante el tiempo que duraron los ensayos de exposición. Se evaluarán, adicionalmente, otros parámetros como el contenido de nitrógeno en el sustrato de las plantas, a fin de correlacionar el estado que visualmente presenta la planta con parámetros bioquímicos.

Además, se procederá a exponer los posibles metabolitos encontrados en las diferentes plantas a lo largo de los ensayos de exposición haciendo uso de un software adecuado (MetaboLynx) aplicado a los datos cromatográficos de cada muestra.

Por otro lado, se expondrán los resultados adquiridos de los distintos test enzimáticos en la colección de 150 plantas del entorno de Doñana, en las muestras de *Juncus sp.* sometidas al ensayo de exposición, así como los resultados provenientes de los test antioxidantes, con el fin de determinar la relación o similitud existente entre los controles positivos que inhiben las distintas enzimas y las muestras que presentan inhibición enzimática y no están documentadas en la bibliografía revisada.

1. HUMEDAD

Se evaluó el porcentaje de humedad de las plantas empleadas en los diferentes ensayos de exposición, ya que las extracciones se realizan sobre plantas previamente desecadas siendo valor necesario para poder expresar los resultados sobre la muestra original. Tallo y hoja de *Lavandula dentata*, presentan entre un 40 y 50% de humedad, al igual que el tallo de las plantas *Juncus sp.* mientras que las raíces de ambas plantas poseen un porcentaje de humedad entre el 10% y el 15%. Sin embargo, el porcentaje de humedad de la raíz de *Salicornia europaea* oscila entre el 9 y 10% y su tallo alrededor del 6%.

2. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN:

RESULTADOS DE ACUMULACIÓN DE FÁRMACOS

Los resultados que se muestran a continuación, se organizan de la siguiente manera:

En el caso de *Lavandula dentata*., las tablas muestran los resultados de dos plantas por cada uno de los tres niveles de concentración de agua de riego empleados en muestras de hoja y tallo (4 cortes, realizados a 7, 14, 21 y 30 días) y raíz (final del ensayo, tras 30 días de exposición), indicados como R1 (correspondiente a P1, P3 y P5) y R2 (correspondiente a P2, P4 y P6). Las muestras se analizaron por duplicado. De igual manera, se muestran los resultados de *Juncus sp.*, para tallo y raíz.

En *Salicornia eu.* los resultados corresponden al análisis de seis plantas a cada uno de los tres niveles de concentración empleados, en muestras de tallo (3 cortes realizados a 7, 14 y 21 días) y raíz (final del ensayo, tras 21 días de exposición). En la mayor parte de los casos, la pequeña cantidad de muestra disponible no permitió el análisis por duplicado.

2.1. *LAVANDULA DENTATA*

En el caso de *Lavandula dentata*, solo se detectaron acumulaciones de los fármacos flumequina y carbamazepina, esto se debe a que la absorción de productos químicos depende en gran medida de la naturaleza hidrofóbica ($\log P$), el estado de ionización de las moléculas, el pKa y el pH del suelo.

Flumequina y carbamazepina se cuantificaron en todas las muestras y en todos los niveles de concentración de las muestras, encontrando como era de esperar mayores concentraciones en las plantas regadas a altas concentraciones ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) identificadas en el ensayo como P1 y P2.

Los resultados en la tabla 12 muestran una clara tendencia de acumulación en las muestras de la raíz para ambos fármacos, alcanzando concentraciones muy altas del orden de $15000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para el caso de la carbamazepina tras 30 días de exposición.

Sin embargo, en las muestras de hojas, se aprecia, como la planta inicialmente acumula concentraciones más altas de ambos fármacos y según avanza la exposición, disminuye de forma gradual la concentración de estos, llegando prácticamente a desaparecer. Estos resultados difieren con resultados publicados previamente por otros autores como Tanoue et al. [206] y Wu. et al. [207] que encontraron concentraciones más altas de CBZ en las hojas que en las raíces de *C. sativus* y hortalizas.

Esto podría ser debido a los daños sufridos por las plantas a lo largo del ensayo de exposición, ya que según avanzaban las semanas, el cambio en el estado morfológico de las plantas fue claramente peor, las hojas se volvieron lacias llegando a morir en los últimos días, de ahí la posible explicación a la falta de acumulación al finalizar el ensayo, puesto que las plantas se encontraban prácticamente muertas.

El mismo comportamiento se observó con la FMQ, en todas las concentraciones en las muestras de hojas, siguiendo una tendencia exponencial decreciente, debido al empeoramiento del estado de las plantas durante el ensayo de exposición.

En el caso de las muestras de tallo, la concentración de FMQ mostró un comportamiento diferente, manteniéndose estable hasta la tercera semana y disminuyendo drásticamente en los últimos siete días, a causa probablemente de los daños sufridos por la planta.

En el caso de CBZ, a bajos niveles de concentración de riego se nota un comportamiento bastante similar al seguido por FMQ, pero sorprendentemente en concentraciones intermedias y altas ($700 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) los resultados obtenidos muestran un máximo de absorción a los 21 días para luego disminuir; esto concuerda con el mal estado general de la planta, en la última semana. Sin embargo, las concentraciones en los primeros 14 días del ensayo fueron muy bajas, en comparación con los resultados obtenidos para FMQ, lo que sugiere la dificultad de las plantas, para absorber CBZ en las primeras etapas del ensayo.

No se detectaron ni CPR ni ENR en ninguna muestra, probablemente por los bajos valores de $\log P$ y $\log K_{ow}$, la fisiología de la planta en sí o degradación del compuesto en el suelo.

Igualmente, no se detectaron IBU y DCL en ninguna muestra. Debido a sus bajos valores de pK_a , estos compuestos se encuentran principalmente como aniones, lo que implica baja absorción por las raíces [208]. Estos resultados están de acuerdo con algunos artículos publicados [206, 209]

sin embargo, Emhofer et al. [210] encontraron DCL inalterado en raíces cultivadas en condiciones hidropónicas después de siete días de riego, esta discrepancia podría atribuirse al bajo potencial de absorción de estos fármacos ($\log P$ y $\log K_{ow}$), a su baja lipofilia o incluso a las condiciones experimentales del ensayo [208].

Tabla 12. Resultados para CBZ y FMQ del ensayo de exposición de *Lavandula dentata*.

Matriz	Niveles	Cortes	Concentración de los compuestos encontrados							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Hoja	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 días	2498	38	1390	17	1156	67	2076	43
		14 días	1672	37	545	31	631	68	468	82
		21 días	245	13	368	61	242	34	361	35
		30 días	150	27	207	4	150	20	62	13
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/P4	7 días	1148	68	1754	24	1556	68	1326	49
		14 días	312	57	413	11	631	20	363	23
		21 días	223	22	676	18	242	6	420	28
		30 días	163	53	353	2	150	19	346	22
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/P6	7 días	141	22	145	18	111	23	220	14
		14 días	69	10	132	8	58	0.2	70	8
		21 días	36	8	83	12	---	---	20	4
		30 días	24	3	21	10	---	---	---	---

*Concentraciones expresadas en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

Matriz	Niveles	Corte	Concentración de los compuestos encontrados							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tallo	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 días	464	9	633	7	764	17	804	47
		14 días	3837	37	1862	57	1020	45	686	16
		21 días	3074	20	2318	37	875	14	490	35
		30 días	15635	272	4630	113	494	27	308	14
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 días	102	6	167	16	502	21	559	4
		14 días	101	9	103	14	666	5	565	14
		21 días	647	11	717	33	417	14	561	8
		30 días	102	12	103	28	160	1	331	12
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 días	109	25	84	39	172	14	209	7
		14 días	101	5	156	25	151	3	184	15
		21 días	129	8	48	18	646	19	79	20
		30 días	54	15	49	4	335	25	57	9
Raíz	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		15035	110	14076	41	1904	16	1924	16
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		1354	32	722	72	195	7	241	9
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		832	9	443	43	127	4	92	3

*Concentraciones expresadas en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

2.2. *JUNCUS SP.*

En *Juncus sp.* se observaron acumulaciones de todos los principios activos salvo IBU. Al igual que en *Lavandula dentata*, las plantas expuestas a altas concentraciones, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, presentan mayor cantidad de principios activos que las sometidas a intermedias y bajas concentraciones, presentando además, una reproducibilidad mayor entre ellas. Los resultados se muestran en las tablas 13 y 14.

CBZ y FMQ fueron cuantificadas en todas las partes de la planta a altas concentraciones en el tallo *Juncus sp.* En el caso de CBZ, se aprecia un aumento en la acumulación hasta los 21 días, estabilizándose la última semana de ensayo, debido probablemente a que la planta ya no era capaz de acumular y metabolizar tanta cantidad de CBZ. Situación contraria se produce en el caso de FMQ, durante las tres primeras semanas la cantidad de este principio activo, se mantiene estable sin grandes alteraciones para experimentar un aumento en la última semana de ensayo, que podría estar relacionado con que esta especie presente dificultad en la absorción de este principio activo. Similares resultados en las curvas de evolución fueron obtenidos con FMQ, a intermedias y bajas concentraciones, así como en la raíz, obteniéndose un escenario distinto para CBZ a concentraciones de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, donde la acumulación de este, decrece en la última semana de ensayo.

En la raíz, CBZ registra los valores más elevados llegando al orden $140000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; esto podría deberse a que, según explica el estudio de Kodesova et al. [211], CBZ se absorbe a través de vías separadas, la absorción de agua se produce principalmente a través de canales de agua regulados o acuaporinas, según la demanda de agua de la planta y la molécula de CBZ, no iónica, se transloca principalmente por un mecanismo de difusión a través de las membranas de las células de la raíz, de ahí que se encuentren altas cantidades de CBZ en las raíces de las plantas [211].

En el caso de CPR, las plantas sometidas a una disolución de riego de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mostraron una gran acumulación de principio activo en la primera semana, produciéndose un descenso brusco en la concentración en las plantas a partir de la segunda semana, para mantenerse estable hasta la finalización del ensayo. Esto puede ser debido a los daños que han sufrido las plantas durante todo el ensayo de exposición, ya que según transcurrían las semanas, éstas manifestaron un deterioro evidente, lo que pudo dificultar la asimilación y metabolización de CPR. Para el resto de los principios activos se observó la situación contraria, aumentando su acumulación hasta la cuarta semana de ensayo.

Similar es la evolución de las plantas expuestas a intermedias y bajas concentraciones de CPR, cuya curva de evolución tiende a disminuir a medida que aumentaban las semanas.

ENR y DCL, no se identificaron en las plantas expuestas a bajas concentraciones. Por el contrario, se observó una acumulación similar de ambos aumentando la cantidad de estos al final del ensayo en las plantas expuestas a concentraciones intermedias de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y mostrando una tendencia estable en las primeras semanas, pero creciendo gradualmente la cantidad acumulada de ambos principios activos en las plantas expuestas a altas concentraciones.

Por último, en la raíz, apenas se obtienen resultados significativos y reproducibles en ambas plantas, lo que demuestra como en el caso de *Lavandula dentata*, la dificultad que presentan en la acumulación y retención las raíces de las plantas.

Tabla 13. Resultados de acumulación de CBZ, FMQ y CPR del ensayo de exposición de *Juncus sp.*

Matriz	Niveles	Cortes	Concentración de los compuestos encontrados											
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*		CPR R1*		CPR R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tallo	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 días	2415	509	1055	3	1957	12	924	22	18994	746	10727	12309
		14 días	8080	306	25219	18	891	131	2169	82	1802	50	1125	126
		21 días	38895	812	39000	827	2183	170	2281	185	1300	0	1365	8
		30 días	39879	384	39931	1499	50444	611	53201	376	1491	48	1139	11
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 días	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 días	7028	118	3379	317	612	22	454	28	190	4	189	18
		21 días	4038	196	2406	48	543	38	420	39	205	27	177	14
		30 días	1285	55	3112	785	2903	70	3903	36	198	11	151	3
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 días	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 días	213	9	200	7	68	1	66	1	167	0.2	----	----
		21 días	89	25	204	1	140	1	138	2	160	10	----	----
		30 días	19	7	10	1	375	12	395	0.5	----	----	----	----
Raíz	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	88817	5354	139321	144	41417	5786	51363	50	900	132	640	8	
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	42572	4437	29020	1767	7171	1038	4612	196	----	----	----	----	
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	1429	41	2873	161	96	3	183	4	----	----	----	----	

*Concentraciones expresadas en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

Tabla 14. Resultados de acumulación de ENR y DCL del ensayo de exposición de *Juncus sp.*

Matriz	Niveles	Cortes	Concentración de compuestos encontrados							
			ENR R1*		ENR R2*		DCL+ R1*		DCL+ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tallos	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 días	627	10	1779	1716	1559	134	6606	7927
		14 días	1455	329	3375	118	2473	131	13949	275
		21 días	3157	240	3251	255	1598	60	1660	68
		30 días	3986	11	4455	440	24023	555	39537	1413
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 días	---	---	---	---	---	---	---	---
		14 días	606	24	559	65	1429	14	619	242
		21 días	576	6	488	64	254	7	306	41
		30 días	662	26	590	9	377	20	632	107
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 días	---	---	---	---	---	---	---	---
		14 días	---	---	---	---	---	---	---	---
		21 días	---	---	---	---	---	---	---	---
		30 días	---	---	---	---	---	---	---	---
Raíz	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		4393	445	----	----	79327	807	----	----
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		508	106	----	----	5696	2098	----	----
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		---	---	----	----	---	---	----	----

*Concentraciones expresadas en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

2.3. *SALICORNIA EUROPAEA*

Al igual que en *Lavandula dentata*, solo se ha observado resultados de acumulación para los principios activos CBZ y FMQ (tabla 15), probablemente, y como ya se ha mencionado con anterioridad (2.1. *Lavandula dentata*) para estos principios activos depende de la naturaleza hidrofóbica ($\log P$), lo que facilita su absorción por parte de la planta.

Se han registrado valores muy reproducibles en las plantas regadas a intermedias y altas concentraciones ($700 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) teniendo las plantas un comportamiento similar durante el ensayo.

Sin embargo a concentraciones de $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ no se constataron acumulaciones de ningún principio activo durante el ensayo. Es probable que la concentración de fármacos no fuese la suficiente para que la planta fuera capaz de absorberlos y metabolizarlos.

La evolución de CBZ, muestra un claro aumento de la cantidad acumulada por la planta en la última semana de ensayo, mostrando en los primeros 15 días, una estabilidad sin cambios, probablemente pasados los 15 días la planta fue capaz de asimilar la CBZ.

En el caso de FMQ, nos encontramos ante una situación parecida, produciéndose un gran aumento en la última semana de ensayo, aunque en este caso, las cantidades medidas en el segundo corte superan claramente a las cantidades de CBZ en el mismo periodo de tiempo lo que indica que la *Salicornia eu.* ha sido capaz de absorber y metabolizar FMQ en mayor medida que CBZ.

En la raíz de la planta solo se encontraron ambos principios activos en las plantas expuestas a concentraciones intermedias y altas, mostrando en la última semana de ensayo, acumulaciones del mismo orden de magnitud que las obtenidas en el tallo de la planta, siendo inferiores a $0.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para las plantas sometidas a concentraciones intermedias, lo que concuerda con los resultados de las acumulaciones para estas en el tallo.

Los demás analitos no fueron cuantificados en esta matriz vegetal, pudiéndose haber producido una situación análoga a la ocurrida en *Lavandula dentata*, en la que, probablemente debido a los bajos valores de pK_a que poseen estos analitos, su absorción a través de las raíces se ve dificultada.

Tabla 15. Resultados de acumulación de CBZ y FMQ del ensayo de exposición de *Salicornia eu.*

Matriz	Niveles	Cortes	Concentración de compuestos encontrados							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R2*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tallos	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 días	0.129	0.018	0.109	0.033	0.076	0.014	0.072	0.005
		14 días	0.221	0.001	0.241	0.005	3.195	0.927	2.709	0.536
		21 días	24.685	0.104	32.629	3.129	14.476	1.328	9.179	0.428
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 días	0.022	0.001	0.023	0.004	0.058	0.001	----	----
		14 días	0.042	0.0003	0.051	0.026	0.186	0.023	0.213	0.085
		21 días	12.054	0.897	10.124	0.105	0.502	0.053	0.787	0.533
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 días	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 días	----	----	----	----	----	----	----	----
		21 días	----	----	----	----	----	----	----	----
Raíz	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		11.105	0.593	9.982	0.753	13.435	2.911	11.661	0.912
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		0.517	0.088	0.394	0.049	0.421	0.228	0.4035	0.145
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		----	----	----	----	----	----	----	----

*Concentraciones expresadas en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

3. CONTENIDO DE NITRÓGENO EN LAS MUESTRAS DE SUSTRATO

Cuando las plantas no disponen de una nutrición equilibrada y se produce una falta de nitrógeno, se originan anormalidades en su desarrollo siendo visibles a través de su morfología. Algunos de estos efectos son, por ejemplo, un crecimiento mucho más lento, las hojas amarillean poco a poco empezando por la parte baja de la planta (clorosis), tienen menos defensas contra plagas y enfermedades y puede aparecer defoliación. Por el contrario, el exceso de nitrógeno en las plantas también les pasa factura reduciendo su producción y calidad de las flores. Este exceso se puede reconocer observando los siguientes síntomas: exceso de follaje en la planta, tallos débiles, hojas en forma de garra mirando hacia el suelo, verde muy intenso en las hojas o poca resistencia a las plagas en general.

En la siguiente tabla 16 se muestran los resultados obtenidos del contenido total de nitrógeno, en los sustratos de las distintas plantas empleadas en los ensayos de exposición y a las distintas concentraciones de disolución de riego.

Tabla 16. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los distintos sustratos de las matrices vegetales.

Muestra	Concentración	%N
<i>Lavandula dentata</i>	10 mg·L ⁻¹	1.6 (0.2)
	700 µg·L ⁻¹	1.4 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	0.7 (0.1)
<i>Juncus sp.</i>	10 mg·L ⁻¹	1.7 (0.3)
	700 µg·L ⁻¹	1.1 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	0.8 (0.1)
<i>Salicornia eu.</i>	10 mg·L ⁻¹	1.8 (0.2)
	700 µg·L ⁻¹	1.4 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	1.1 (0.1)

El contenido de nitrógeno en el sustrato de *Lavandula dentata*, aumenta al aumentar la concentración a la que han sido expuestas las plantas durante el ensayo de exposición, con lo que parte de ese contenido de nitrógeno proviene de los grupos amino y amida de los fármacos que continen en nitrógeno, todos salvo ibuprofeno. La misma situación se observa en las muestras de sustrato de *Juncus sp.* en el que el porcentaje de nitrógeno disminuye al disminuir la concentración de analitos a la cual han sido sometidas las plantas. Estas dos matrices vegetales han sido

cultivadas en un sustrato universal, cuyo contenido en nitrógeno oscila entre un 0.7-1% [212] lo que indica que parte del nitrógeno obtenido en el sustrato de ambas plantas proviene de los fármacos administrados durante los ensayos de exposición.

En el caso de la *Salicornia eu.* al estar cultivada en sustrato de fibra de coco por tratarse de una planta halófila como se ha mencionado anteriormente, posee un alto contenido en sales y el contenido de nitrógeno en estos sustratos se sitúa en un 1.2% [213], porcentaje similar al obtenido en las plantas sometidas a bajas concentraciones en el ensayo de exposición y llegando al 1.8% de nitrógeno en las muestras de sustrato de las plantas expuestas a una concentración de principios activos de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Estos resultados están en cierta medida correlacionados con los obtenidos en las acumulaciones de los distintos principios activos en las plantas, siendo gradual la cantidad encontrada de analitos a las distintas concentraciones, lo que justifica la absorción producida a elevadas concentraciones y la baja o carente acumulación en la mayoría de las plantas expuestas a bajos niveles de concentración. Los valores de nitrógeno coincidentes en el ensayo de exposición de baja concentración con los referenciados bibliográficamente en los sustratos empleados para el cultivo de las plantas, avalan la tesis de una más baja absorción de los fármacos en el sustrato y por tanto en la planta a un nivel de exposición de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, avalan el estado de evolución de las plantas: las expuestas a bajas concentraciones apenas sufrieron cambios físicos, frente a las expuestas a unas concentraciones de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ que murieron al final del ensayo.

4. POSIBLES METABOLITOS DETECTADOS EN LAS PLANTAS ENSAYADAS

Se exponen a continuación los resultados obtenidos al aplicar el software MetaboLynx a extractos correspondientes a las diferentes partes de las plantas a lo largo de los ensayos de exposición. De esta forma, se puede detectar la presencia de posibles metabolitos y/o productos de degradación relacionados con los diferentes analitos suministrados durante los ensayos de exposición. Con todo ello, se pretende establecer correlaciones entre los compuestos identificados, estado de la planta y niveles encontrados de los principios activos suministrados. Asimismo, se analizará la posible influencia de la especie vegetal estudiada. Los resultados se presentan organizados en secciones en las que se recogen los principales posibles metabolitos para cada principio activo y planta estudiada.

Los resultados se presentan organizados en secciones en las que se recogen los principales posibles metabolitos para cada principio activo y planta estudiada. Adicionalmente, en el anexo I, se detalla, en cada caso, las rutas metabólicas implicadas en la formación de los posibles metabolitos identificados.

Las tablas correspondientes al análisis de *Lavandula dentata* recogen los posibles metabolitos de dos plantas (se muestran los valores de los duplicados separados por barras en una misma celda en caso positivo en ambas réplicas, al igual que en *Salicornia eu.*), obtenidas en los cuatro cortes realizados (7, 14, 21 y 30 días). Los resultados aparecen diferenciados por colores según la parte de la planta analizada: verde para la hoja, marrón para tallo y raíz en negro.

En el caso de *Juncus sp.*, las tablas muestran los resultados de dos plantas a los tres niveles de concentración de agua de riego empleados en muestras de tallo (4 cortes realizados a 7, 14, 21 y 30 días) y raíz (final del ensayo, tras 30 días de exposición). Las muestras se analizaron por duplicado recogiendo en las tablas los valores obtenidos en cada réplica separados por barras (en caso negativo en alguna réplica solo aparecerá un dato en la celda correspondiente al metabolito correspondiente).

En *Salicornia eu.* los resultados corresponden al análisis de seis plantas a cada uno de los tres niveles de concentración empleados, en muestras de tallo (3 cortes realizados a 7, 14 y 21 días) y raíz (final del ensayo, tras 21 días de exposición). En la mayor parte de los casos, la pequeña cantidad de muestra disponible no permitió el análisis por duplicado.

4.1. CARBAMAZEPINA EN *LAVANDULA DENTATA*

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos tras procesado mediante el software MetaboLynx de los posibles metabolitos encontrados en las muestras de *Lavandula dentata* expuestas a carbamazepina. En verde se muestran los resultados correspondientes al procesado de las hojas de esta planta en los diferentes cortes, en marrón de los tallos correspondientes, y en negro, los posibles metabolitos encontrados al procesar las muestras de raíz.

El número de metabolitos detectados decrece de forma directa con la concentración de las disoluciones de los ensayos de exposición, y las posibles rutas metabólicas implicadas pueden ser consultadas con detalle en las correspondientes tablas del anexo.

Se aprecia que es la raíz de la planta la que acumula más posibles metabolitos, siendo la ruta metabólica de doble hidroxilación con pérdida del fragmento $-CHNO$, que se corresponde con el

metabolito CBZ-L 8, la más frecuente. Este metabolito aparece en todas las concentraciones ensayadas, así como en muestras de tallo expuestas a concentraciones intermedias de disolución ($700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la planta P4, aunque no así en su réplica (planta P3).

El metabolito CBZ-L 2, procedente de una desetilación con pérdida del fragmento $-\text{CHNO}$ y que aparece a un tiempo de retención de 11.29 minutos, predomina en las muestras del tallo, sobretodo en las plantas que han sido expuestas a altas concentraciones de disolución (P1), encontrándose en ambos especímenes expuestos.

La ruta metabólica de doble hidroxilación con pérdida del grupo $-\text{HN}$, conduce al metabolito CBZ-L 12. Este metabolito, que aparece en toda la planta, abunda en aquellas expuestas a altas concentraciones de disolución, siendo más baja su cantidad a concentración intermedia y baja.

Tabla 17. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CBZ-L 9	1054	CBZ-L 11	1057	CBZ-L 2	5180	CBZ-L 2	3671	CBZ-L 8	1135
				CBZ-L 14	1029	CBZ-L 6	1952				
				CBZ-L 6	1737						
	P1			CBZ-L 11	1037	CBZ-L 6	1948	CBZ-L 2	3581	CBZ-L 12	236
				CBZ-L 9	1249	CBZ-L 2	4892				
				CBZ-L 2	1679						
				CBZ-L 6	1737						
	P2	*		CBZ-L 12	620					CBZ-L 8	1391
	P2	*		CBZ-L 12	705					CBZ-L 8	1543
		*								CBZ-L 1	7322
*									CBZ-L 7	977	
700 µg/L	P3	*								CBZ-L 8	3928
		*									
	P3	*									
		*									
	P4	*				CBZ-L 15	1774			CBZ-L 8	2363
		*				CBZ-L 7	1103			CBZ-L 5	7088
		*				CBZ-L 8	542			CBZ-L 13	1123
	P4	*				CBZ-L 8	348			CBZ-L 8	6270
		*				CBZ-L 4	3950			CBZ-L 5	7818
	10 µg/L	P5	*		CBZ-L 10	2772	CBZ-L 2	1385	CBZ-L 12	251	CBZ-L 8
*								CBZ-L 15	774	CBZ-L 3	227
P5		*		CBZ-L 10	3150			CBZ-L 15	782		
		*									
		*									
		*									
P6		*								CBZ-L 8	1664
		*								CBZ-L 5	2405
		*									
P6		*								CBZ-L 8	1205
		*									

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.2. FLUMEQUINA EN *LAVANDULA DENTATA*

La tabla 18 recoge los posibles metabolitos obtenidos del ensayo de exposición de *Lavandula dentata* con el principio activo flumequina.

En el segundo corte de la planta equivalente a la segunda semana de ensayo, es cuando se observa el mayor número de posibles metabolitos, sobre todo en muestras de hojas. Destacar también que se solo se han encontrado posibles metabolitos en las hojas de plantas del primer corte, expuestas a alta concentración de flumequina.

La ruta metabólica correspondiente a una hidratación con pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno, da lugar al metabolito FMQ-L 20, con tiempo de retención de 11.07 minutos. Aparece en las muestras de tallo y hoja, a partir de los 15 días de ensayo, independientemente de la concentración a la cual se ha sometido las plantas, alcanzando cantidades superiores a las 6500 u.a. A bajas concentraciones no se observa tras el segundo corte.

El metabolito FMQ-L 30 correspondiente a una hidroxilación, con un tiempo de retención de 14.42 minutos se encuentra tanto en la raíz, como en algunas de las muestras de hoja correspondientes al primer y segundo corte de *Lavandula dentata*, disminuyendo la cantidad encontrada del mismo, según disminuye la concentración a la cual han sido sometidas las plantas en el ensayo de exposición.

En la raíz, se encuentra a todas las concentraciones ensayadas el metabolito FMQ-L 7, correspondiente a una deshidratación de alcoholes con pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno, a un tiempo de retención de 12.67 minutos con una masa teórica y encontrada de 225.0790 y 226.0858 respectivamente, alcanzando cantidades entre los 560 y 1700 u.a. en todas las concentraciones a las que se ha realizado el ensayo.

De forma general, las plantas sometidas a bajas concentraciones en el ensayo de exposición (plantas P5 y P6), exhiben una baja formación de metabolitos, salvo en el segundo corte de la planta, al encontrarse la mayoría de ellos en las plantas empleadas como control, situación contraria es la que sucede en las plantas expuestas a altas concentraciones (P1). La ausencia de metabolitos en la mayoría de estas plantas podría estar relacionado con el estado de las mismas, al empeorar de forma progresiva según transcurrían las semanas de ensayo, llegando a estar prácticamente muertas al final del mismo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de las acumulaciones de los principios activos de carbamazepina y flumequina en las matrices de las hojas y tallo de *Lavandula dentata*, encontrándose mayores acumulaciones en la segunda semana de ensayo.

Tabla 18. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con flumequina. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	FMQ-L 11	941	FMQ-L 3	875					FMQ-L 7	1135
		FMQ-L 19	656	FMQ-L 31	176						
		FMQ-L 28	1121								
		FMQ-L 30	2438								
	P1			FMQ-L 22	395					FMQ-L 2	2029
	P2	*		FMQ-L 12	1115	FMQ-L 15	3074			FMQ-L 7	1391
		*		FMQ-L 24	555	FMQ-L 19	1847				
	P2	*		FMQ-L 6	322	FMQ-L 15	2825	FMQ-L 15	1538	FMQ-L 2	2779
		*		FMQ-L 18	364/354	FMQ-L 19	3376	FMQ-L 19	3443	FMQ-L 7	1543
		*				FMQ-L 20	2037	FMQ-L 20	1823		
700 µg/L	P3	*		FMQ-L 8	5819			FMQ-L 3	975	FMQ-L 30	522
		*		FMQ-L 9	18324			FMQ-L 24	505		
		*		FMQ-L 10	6151			FMQ-L 25	528		
		*		FMQ-L 14	1437						
	P3	*		FMQ-L 1	32476			FMQ-L 26	685	FMQ-L 6	3929
		*		FMQ-L 8	4777			FMQ-L 27	184	FMQ-L 7	607
		*		FMQ-L 10	5712						
		*		FMQ-L 14	2639						
	P4	*				FMQ-L 19	1878	FMQ-L 15	5997	FMQ-L 4	1150
		*				FMQ-L 23	5584	FMQ-L 9	21124	FMQ-L 6	6270
		*						FMQ-L 19	4556		
		*						FMQ-L 20	3685		
	P4	*		FMQ-L 1	71565	FMQ-L 15	1700			FMQ-L 6	2363
		*		FMQ-L 9	69823	FMQ-L 19	2154				
		*		FMQ-L 15	8784	FMQ-L 20	1063				
		*		FMQ-L 19	6916	FMQ-L 21	2012				
		*		FMQ-L 20	4752	FMQ-L 23	5965				
		*				FMQ-L 29	254				
10 µg/L	P5	*		FMQ-L 8	7657	FMQ-L 19	725	FMQ-L 8	639		
		*		FMQ-L 9	21799			FMQ-L 14	568		
		*		FMQ-L 10	6314			FMQ-L 16	464		
		*		FMQ-L 15	9912			FMQ-L 23	1827		
		*		FMQ-L 17	2195						
		*		FMQ-L 19	4917						
		*		FMQ-L 20	2550						
		*		FMQ-L 30	1678						
	P5	*		FMQ-L 6	2190			FMQ-L 27	724	FMQ-L 5	1357
		*		FMQ-L 9	60955			FMQ-L 13	420	FMQ-L 7	563
		*		FMQ-L 10	11080						
		*		FMQ-L 15	10755						
		*		FMQ-L 19	11778						
		*		FMQ-L 20	6590						
		*		FMQ-L 9	30680						
		*		FMQ-L 15	4191						
		*		FMQ-L 19	5859						
		*		FMQ-L 20	3865						
	P6	*		FMQ-L 3	958					FMQ-L 7	1205
		*		FMQ-L 30	594					FMQ-L 30	540
	P6	*		FMQ-L 29	197	FMQ-L 1	26229			FMQ-L 6	1665
		*		FMQ-L 30	649	FMQ-L 15	3441			FMQ-L 7	1625
		*		FMQ-L 1	74607	FMQ-L 19	4780				
		*		FMQ-L 9	53128						
		*		FMQ-L 15	5107						
		*		FMQ-L 19	8311						
		*		FMQ-L 20	5579						

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.3. CIPROFLOXACINA EN *LAVANDULA DENTATA*

En la tabla 19 se muestran los posibles metabolitos obtenidos en las muestras de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con ciprofloxacina.

Se observa, en primer lugar, que en el primer corte de la planta correspondiente a la primera semana de ensayo de exposición, solo aparecen metabolitos en las hojas de una planta expuesta a altas concentraciones del fármaco. Las muestras del tercer corte, tanto tallos como hojas, son las que muestran el mayor número de metabolitos, sobre todo a alta e intermedia concentración de disoluciones de riego.

Las rutas metabólicas de acetilación con pérdida de un fragmento $-C_3H_4$, orignan, entre otros, los metabolitos CPR-L 36 y CPR-L 37 con la misma masa teórica 333.1125 m/z, misma fórmula empírica $C_{16}H_{16}FN_3O_4$ pero distintos tiempos de retención, 4.78 y 5.62 minutos respectivamente. Estos metabolitos se forman tanto en tallos y hojas de plantas sometidas a altas, intermedias y bajas concentraciones (P1, P4 y P5), durante las cuatro semanas de ensayo, y alcanzó cantidades de más de 27000 u.a. a los 30 días de ensayo de exposición.

El metabolito CPR-L 1, formado a partir de la molécula padre con pérdida del fragmento $-C_4H_8N_2$ predomina en las muestras de tallo de *Lavandula dentata* independientemente de la semana de ensayo y de la concentración a la cual se ha expuesto la planta, aunque también se encuentra en las muestras de las hojas de la planta P5 sometida a bajas concentraciones.

En la raíz de todas las plantas independientemente de la concentración de disolución dopante a la que han sido expuestas, se encuentra el metabolito CPR-L 48. Este metabolito se asigna a una acetilación con pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno. Por otro lado, la formación del metabolito CPR-L 5, con una fórmula empírica de $C_{14}H_{14}FN_3O_2$ y un tiempo de retención de 3.19 minutos, se origina solamente en las plantas de expuestas a intermedias y altas concentraciones. Es destacable el alto número de metabolitos encontrados en las raíces de todas las plantas al final del ensayo de exposición. En las correspondientes tablas del anexo I, se puede consultar una descripción detallada de los mecanismos implicados en la formación de los diferentes metabolitos detectados.

Tabla 19. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con ciprofloxacina. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CPR-L 8	1228	CPR-L 9	1996	CPR-L 36	27639	CPR-L 36	27662	CPR-L 15	855
		CPR-L 36	15049	CPR-L 19	596	CPR-L 37	7697			CPR-L 28	221
				CPR-L 36	4531	CPR-L 43	13704			CPR-L 30	908
				CPR-L 43	5525					CPR-L 44	453
				CPR-L 41	2784					CPR-L 45	3833
										CPR-L 46	924
	P1			CPR-L 4	584					CPR-L 48	34008
				CPR-L 7	5390					CPR-L 12	1335
				CPR-L 19	634					CPR-L 31	4223
										CPR-L 46	825
	P2	*		CPR-L 12	223	CPR-L 40	5659	CPR-L 1	3074	CPR-L 48	18708
		*						CPR-L 3	3184	CPR-L 5	904
		*						CPR-L 40	14111	CPR-L 24	1450
		*						CPR-L 43	15064	CPR-L 26	629
		*								CPR-L 35	999
	P2	*		CPR-L 21	4765	CPR-L 1	2825	CPR-L 1	1538	CPR-L 48	17309
		*				CPR-L 6	100752	CPR-L 6	54446	CPR-L 5	1560
		*				CPR-L 43	16685	CPR-L 40	10265	CPR-L 48	17178
700 µg/L	P3	*		CPR-L 2	8508	CPR-L 17	4936				
		*		CPR-L 43	11890	CPR-L 18	3802			CPR-L 5	1575
		*				CPR-L 29	4788			CPR-L 11	645
	P3	*				CPR-L 17	4939			CPR-L 48	12501
		*				CPR-L 18	2438			CPR-L 5	1349
		*								CPR-L 12	1415
		*								CPR-L 20	3609
		*								CPR-L 23	10703
		*								CPR-L 46	1041
	P4	*		CPR-L 1	8784	CPR-L 10	3124	CPR-L 1	5997	CPR-L 48	12285
		*		CPR-L 9	3595	CPR-L 21	3660	CPR-L 6	69785	CPR-L 27	2572
		*		CPR-L 43	9570	CPR-L 36	11415	CPR-L 40	21112	CPR-L 35	1525
		*				CPR-L 36	5361	CPR-L 42	10684	CPR-L 39	1167
		*				CPR-L 37	3071			CPR-L 48	8281
		*				CPR-L 41	6996				
	P4	*		CPR-L 14	27330	CPR-L 3	2058			CPR-L 12	1149
		*		CPR-L 32	1881	CPR-L 9	987			CPR-L 25	1290
		*				CPR-L 16	2694			CPR-L 26	1492
		*				CPR-L 19	883			CPR-L 27	2452
		*				CPR-L 36	12126			CPR-L 39	1158
		*				CPR-L 36	5109			CPR-L 47	587
		*				CPR-L 37	3168			CPR-L 48	10024
		*				CPR-L 38	2643				
10 µg/L	P5	*		CPR-L 1	10755			CPR-L 6	55300	CPR-L 16	1388
		*		CPR-L 14	37517			CPR-L 9	890/1689	CPR-L 33	1131
		*						CPR-L 36	3326	CPR-L 48	12421
		*						CPR-L 40	12428		
		*						CPR-L 43	4133		
	P5	*		CPR-L 1	4191	CPR-L 9	687	CPR-L 9	665	CPR-L 12	1095
		*		CPR-L 9	3999	CPR-L 36	3020	CPR-L 36	3180	CPR-L 13	2364
		*		CPR-L 25	1956	CPR-L 37	2135	CPR-L 37	2241	CPR-L 33	1047
		*		CPR-L 34	3695					CPR-L 48	12413
		*		CPR-L 42	6623						
	P6	*		CPR-L 1	5107	CPR-L 43	33061			CPR-L 22	420
		*								CPR-L 25	621
		*								CPR-L 35	526
		*								CPR-L 48	6024
		*								CPR-L 49	904
	P6	*		CPR-L 12	202					CPR-L 12	1179
		*		CPR-L 13	739					CPR-L 22	455
		*		CPR-L 18	1744					CPR-L 35	745
		*		CPR-L 22	857					CPR-L 48	8593

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.4. ENROFLOXACINA EN *LAVANDULA DENTATA*

En la tabla 20 se muestran los posibles metabolitos encontrados en las plantas sometidas a exposición de enrofloxacin. Se observa, en primer lugar, que en el primer corte de las plantas no se encuentran metabolitos, mientras que en el segundo corte, equivalente a los 15 días de ensayo aparecen un importante número de posibles metabolitos. En las plantas sometidas a alta concentración de enrofloxacin en el agua de riego, el número de metabolitos disminuye drásticamente en el tercer corte (solo en tallo) e incluso no aparecen en el último corte, lo que podría tener relación con una importante disfunción en la fisiología de las plantas sometidas a esas concentraciones elevadas de principio activo. Una descripción de los mecanismos implicados en la formación de los diferentes metabolitos detectados puede encontrarse en las correspondientes tablas del anexo I.

El metabolito ENR-L 16 correspondiente a una ruta metabólica de desetilación con pérdida del fragmento $-C_2H_2$, se origina en las muestras de hoja indistintamente de la concentración a la que esté sometida la planta, aunque aparece en diferentes momentos del ensayo en función de la concentración de la disolución de riego. El metabolito ENR-L 4, de masa teórica 217.0539 m/z y un tiempo de retención de 8.81 minutos, se encuentra a partir de la segunda semana de ensayo, en hojas de ambas réplicas, con órdenes de magnitudes similares, salvo en las plantas P1 sometidas a altas concentraciones.

Las rutas metabólicas correspondientes a la pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno generan los metabolitos, ENR-L 34 y ENR-L 35 con distintos tiempos de retención pero con las mismas masas teóricas. Ambos metabolitos, aparecen desde el segundo corte de tallo hasta finalizar el ensayo, predominando en las muestras sometidas a concentraciones bajas e intermedias (plantas P5 y P4).

La ruta metabólica de deshidratación de alcoholes con pérdida del grupo C_2H_4 , se forma el metabolito ENR-L 20, generado sobre todo en la raíz de la planta en las muestras expuestas a una concentración de $10 \mu g \cdot L^{-1}$ (P6) y en las hojas de *Lavandula dentata* expuestas a la misma concentración durante el segundo corte, correspondiente a los 15 días de ensayo.

En la raíz, se forman en las plantas expuestas a altas (P1 y P2) y bajas (P5) concentraciones los metabolitos ENR-L 37 y ENR-L 48, alcanzando este último más de 4000 u.a. en las raíces de las plantas P1 y P2, mientras que el metabolito ENR-L 37 que se corresponde a una reducción con pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno, disminuye de forma gradual, según disminuye la concentración de la disolución a la que se han expuesto las plantas.

Tabla 20. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacin. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1			ENR-L 7	5390	ENR-L 28	1069			ENR-L 3	2295
				ENR-L 16	634					ENR-L 37	10377
				ENR-L 21	541					ENR-L 46	2530
				ENR-L 27	884					ENR-L 48	1976
				ENR-L 8	1996						
				ENR-L 9	983						
				ENR-L 31	7807						
				ENR-L 34	8646						
				ENR-L 35	7905						
				ENR-L 39	4448						
				ENR-L 50	3187						
				ENR-L 51	2704						
	P1			ENR-L 16	596						
				ENR-L 19	6796						
				ENR-L 34	559						
				ENR-L 36	982						
	P2	*		ENR-L 1	1117	ENR-L 11	9319			ENR-L 37	24758
		*		ENR-L 4	6627	ENR-L 30	5659			ENR-L 46	4799
		*		ENR-L 26	5689	ENR-L 31	9638			ENR-L 48	4456
		*		ENR-L 36	1323						
		*		ENR-L 55	743						
	P2	*		ENR-L 4	5780	ENR-L 6	3184			ENR-L 37	22789
		*		ENR-L 29	1375	ENR-L 30	14111			ENR-L 46	5170
		*				ENR-L 47	6499			ENR-L 48	4010
700 µg/L	P3	*						ENR-L 14	2438	ENR-L 3	2322
		*						ENR-L 27	5326	ENR-L 25	1067
		*						ENR-L 56	349		
	P3	*						ENR-L 4	5806		
		*						ENR-L 43	639		
	P4	*		ENR-L 5	8784	ENR-L 4	3540	ENR-L 32	707	ENR-L 14	687
		*		ENR-L 23	11798	ENR-L 14	1887	ENR-L 53	846	ENR-L 15	4857
		*		ENR-L 34	12662	ENR-L 16	1081	ENR-L 30	21112	ENR-L 20	827
		*		ENR-L 35	2508	ENR-L 17	4055	ENR-L 42	26057	ENR-L 22	1290
		*		ENR-L 54	17093	ENR-L 21	1774			ENR-L 26	11611
		*				ENR-L 31	9220			ENR-L 40	472
		*				ENR-L 38	2106			ENR-L 46	1856
		*				ENR-L 34	8540				
		*				ENR-L 35	2902				
		*				ENR-L 51	2117				
	P4	*				ENR-L 4	3086	ENR-L 26	449	ENR-L 11	944
		*				ENR-L 17	4542	ENR-L 53	1246	ENR-L 15	4391
		*				ENR-L 21	911			ENR-L 26	10832
		*				ENR-L 31	9158				
		*				ENR-L 34	6069				
		*				ENR-L 35	2919				
		*									
10 µg/L	P5	*						ENR-L 17	2102	ENR-L 11	945
		*						ENR-L 31	9934	ENR-L 37	6892
		*						ENR-L 34	11329	ENR-L 46	2008
		*						ENR-L 35	2930	ENR-L 48	1117
		*						ENR-L 39	1774		
		*						ENR-L 44	718		
	P5	*		ENR-L 2	10994	ENR-L 8	687	ENR-L 9	1040	ENR-L 37	6280
		*		ENR-L 5	4191	ENR-L 13	357	ENR-L 13	1823	ENR-L 46	2461
		*		ENR-L 33	2059	ENR-L 17	2157	ENR-L 21	1042	ENR-L 48	1167
		*		ENR-L 34	13818	ENR-L 31	9568	ENR-L 23	8073		
		*		ENR-L 52	13918	ENR-L 34	13235	ENR-L 31	10183/10115		
		*				ENR-L 35	2813	ENR-L 34	4778		
		*				ENR-L 45	10183	ENR-L 35	6062		
		*				ENR-L 51	1486	ENR-L 39	2726		
		*						ENR-L 41	1072		
		*						ENR-L 49	7977		
	P6	*		ENR-L 2	11874	ENR-L 27	8614			ENR-L 3	1299
		*		ENR-L 8	2948	ENR-L 23	10033			ENR-L 15	3009
		*		ENR-L 52	13566	ENR-L 31	11650			ENR-L 18	4034
		*		ENR-L 4	6649	ENR-L 42	7205			ENR-L 20	420
		*		ENR-L 14	1607					ENR-L 25	1010
		*		ENR-L 16	910						
		*		ENR-L 4	6713					ENR-L 11	1179
	P6	*		ENR-L 12	739					ENR-L 15	2939
		*		ENR-L 14	1744					ENR-L 18	4230
		*		ENR-L 20	857					ENR-L 20	455
		*		ENR-L 32	570						
		*		ENR-L 36	5646						
		*		ENR-L 57	470						
		*									

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.5. DICLOFENACO EN *LAVANDULA DENTATA*

En la tabla 21, se recogen los posibles metabolitos de diclofenaco obtenidos en el tallo, hoja y raíz de *Lavandula dentata*. se observa, en primer lugar, la ausencia de metabolitos en cualquier parte de la planta tras la primera semana de ensayo, a excepción de las hojas de las plantas regadas con la disolución de mayor concentración, y como el número de metabolitos aumenta de forma drástica a partir de los 15 días de ensayo de exposición, (segundo corte), para disminuir a la tercera semana de ensayo y finalmente aumentar de nuevo a los 30 días. El número de posible metabolitos detectados en las muestras de raíz al final del ensayo es extraordinariamente menor al de hojas y tallos en cualquier fase del ensayo, si exceptuamos la primera semana.

El metabolito DCL-L 4 (fruto de la pérdida de un hidroximetileno), se encuentra en las hojas de las plantas regadas con altas y bajas concentraciones de disolución de riego (P1, P2 y P6) en el segundo corte, no así en las regadas a concentraciones intermedias.

La ruta metabólica procedente del compuesto original con pérdida de un fragmento $-C_6H_3NCl_2$ origina el metabolito DCL-L 10, identificado tanto en el tallo como en la hoja de *Lavandula dentata* a todas las concentraciones a las que se ha regado la planta, predominando en el tercer corte a intermedias y bajas concentraciones y alcanzando más de 60000 u.a., mientras que el metabolito DCL-L 14, con la misma ruta metabólica pero distintos tiempo de retención y masa, predomina en el cuarto corte de la planta correspondiente a la última semana de ensayo. Ninguno de estos compuestos ha sido identificado en la raíz de ninguna planta al final del ensayo.

El metabolito DCL-L 21, procedente de una hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$ se encuentra en las hojas de *Lavandula dentata* en el segundo corte realizado, así como en las hojas y tallo de la misma a partir de los 21 días de ensayo, tanto en intermedias como en bajas concentraciones de disolución administrada, alcanzando mayores cantidades en las plantas regadas con la disolución más diluida.

El metabolito DCL-L 5, con ruta metabólica de desmetilación y pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$, ha sido identificado en muestras de hojas a lo largo del ensayo, con picos cromatográficos, en general, de áreas extremadamente grandes.

En la raíz se observa a todas las concentraciones la formación del metabolito DCL-L 24, proveniente de una hidratación con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$. Cabe señalar aquí que, en general, el número de posibles metabolitos detectados en la raíz es sustancialmente inferior a aquellos identificados en plantas de *Lavandula dentata* regadas con otros principios activos.

Tabla 21. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Area	Metab.	Area	Metab.	Area	Metab.	Area	Metab.	Area
10 mg/L	P1	DCL-L 7	15702	DCL-L 1	14509	DCL-L 1	43028	DCL-L 14	81369	DCL-L 24	3099
		DCL-L 14	65927	DCL-L 6	7391	DCL-L 14	84973	DCL-L 15	42472		
		DCL-L 20	40245	DCL-L 15	24981	DCL-L 15	74435	DCL-L 20	97287		
		DCL-L 10	21265	DCL-L 41	837	DCL-L 22	151364	DCL-L 21	16002		
		DCL-L 11	9971	DCL-L 48	1113	DCL-L 34	61655	DCL-L 37	819		
		DCL-L 12	6931	DCL-L 4	97424	DCL-L 36	2386	DCL-L 41	1196		
		DCL-L 13	9806	DCL-L 40	549	DCL-L 49	2025	DCL-L 8	13847		
	P1					DCL-L 8	27847				
		DCL-L 33	7120	DCL-L 4	132624	DCL-L 10	11690	DCL-L 9	101538		
	P2	*		DCL-L 47	272						
		*		DCL-L 4	38845	DCL-L 44	112			DCL-L 24	4959
	P2	*				DCL-L 46	160				
		*		DCL-L 4	33249						
700 µg/L	P3	*		DCL-L 5	170372			DCL-L 4	52951	DCL-L 24	1775
		*		DCL-L 16	23820			DCL-L 15	22094		
		*		DCL-L 21	46723			DCL-L 16	19131		
		*		DCL-L 30	9135			DCL-L 17	4038		
		*		DCL-L 43	2155			DCL-L 21	161585		
		*		DCL-L 11	29032			DCL-L 32	3090		
		*		DCL-L 12	18174			DCL-L 10	61667		
		*		DCL-L 20	1363			DCL-L 11	30839		
		*		DCL-L 40	655			DCL-L 12	23040		
		*		DCL-L 5	209522			DCL-L 4	52222	DCL-L 24	1894
		*		DCL-L 16	23589			DCL-L 5	201473		
		*		DCL-L 21	47124			DCL-L 15	22318		
	P3	*		DCL-L 43	3163			DCL-L 16	12716		
		*		DCL-L 11	27667			DCL-L 21	149078		
		*		DCL-L 12	17930			DCL-L 32	2331		
		*		DCL-L 39	13847			DCL-L 10	59313		
		*						DCL-L 11	32222		
		*						DCL-L 12	23373		
		*		DCL-L 5	23553	DCL-L 1	16061	DCL-L 2	7172	DCL-L 23	964
		*		DCL-L 21	10512	DCL-L 2	29443	DCL-L 14	32605	DCL-L 27	2214
	P4	*		DCL-L 25	8268	DCL-L 14	19339	DCL-L 15	30864	DCL-L 50	807
		*		DCL-L 43	3322	DCL-L 15	10109	DCL-L 19	2904		
		*		DCL-L 10	62712	DCL-L 5	45932	DCL-L 29	772		
		*		DCL-L 11	26597	DCL-L 20	20113	DCL-L 40	306		
		*		DCL-L 12	17176	DCL-L 21	14537				
		*		DCL-L 28	12737	DCL-L 3	2175				
		*		DCL-L 31	8726	DCL-L 10	33349				
		*		DCL-L 40	712	DCL-L 10	29568				
		*				DCL-L 35	2488				
		*		DCL-L 25	7923	DCL-L 1	14990	DCL-L 14	26865	DCL-L 23	1093
	P4	*		DCL-L 10	73843	DCL-L 21	11357	DCL-L 15	32482	DCL-L 50	845
		*		DCL-L 11	31353	DCL-L 5	32512	DCL-L 29	570		
		*		DCL-L 12	20779	DCL-L 14	35275				
		*		DCL-L 18	37	DCL-L 21	25946				
		*		DCL-L 28	13734	DCL-L 22	452				
		*		DCL-L 40	878	DCL-L 32	5325				
		*				DCL-L 3	2114				
		*				DCL-L 10	34119				
		*				DCL-L 10	29868				
		*				DCL-L 39	1212				
10 µg/L	P5	*				DCL-L 39	6314				
		*		DCL-L 21	82578	DCL-L 14	19955	DCL-L 1	14555	DCL-L 23	1246
		*		DCL-L 3	1485	DCL-L 15	37063	DCL-L 14	21419	DCL-L 24	1877
		*		DCL-L 8	53786	DCL-L 45	490	DCL-L 15	17839		
		*		DCL-L 10	67278	DCL-L 9	54604	DCL-L 3	2452		
		*		DCL-L 11	62839			DCL-L 10	23462		
		*		DCL-L 12	43204			DCL-L 34	19157		
		*		DCL-L 13	23393						
		*		DCL-L 39	14534						
		*		DCL-L 5	186849			DCL-L 1	16708	DCL-L 24	1774
		*		DCL-L 8	62235			DCL-L 3	2210	DCL-L 42	2607
		*		DCL-L 17	4548			DCL-L 14	21268		
	P5	*		DCL-L 21	85356			DCL-L 15	20153		
		*		DCL-L 10	64174			DCL-L 21	35011		
		*		DCL-L 11	65885						
		*		DCL-L 12	41186						
		*		DCL-L 13	24537						
		*		DCL-L 39	13101						
		*		DCL-L 4	77052					DCL-L 24	4574
		*		DCL-L 26	3058					DCL-L 38	318
	P6	*		DCL-L 32	3320					DCL-L 42	1416
		*		DCL-L 4	75458					DCL-L 24	4633
	P6	*								DCL-L 42	1515

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.6. IBUPROFENO EN *LAVANDULA DENTATA*

En la tabla 22 se muestran los posibles metabolitos obtenidos para las plantas de *Lavandula dentata* sometidas al ensayo de exposición con ibuprofeno.

Al igual que en el caso anterior, no se detectaron metabolitos en tallos y hojas tras el primer corte así como en las raíces de las plantas tras la finalización de los ensayos de exposición. El mayor número de metabolitos se detectó en las hojas de las plantas y en los cortes 2 y 4, y en este último solo en las hojas de plantas expuestas a concentraciones intermedias de ibuprofeno y solo en los tallos de las expuestas a alta y baja concentración del principio activo, equivalente a los 30 días de ensayo que a los 15 días de ensayo como sucedió en casos anteriores.

El metabolito IBU-L 9, procedente de una acetilación, es el más abundante, encontrándose tanto en la hoja como en el tallo de plantas expuestas a intermedias y bajas concentraciones, alcanzando más de 3500 u.a.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, una descripción de los mecanismos implicados en la formación de los diferentes metabolitos detectados puede encontrarse en las correspondientes tablas del anexo I.

Tabla 22. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Lavandula dentata* sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno. (En verde muestras de hojas, en marrón muestras de tallos).

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1			IBU-L-2	918			IBU-L-6	18482		
								IBU-L-7	3018		
	P1										
	P2	*									
700 µg/L	P2	*									
	P3	*		IBU-L-4	6330			IBU-L-2	2267		
		*		IBU-L-5	38734			IBU-L-9	3002		
		*		IBU-L-8	3843						
		*		IBU-L-9	3216						
	P3	*		IBU-L-4	5925			IBU-L-2	1910		
		*		IBU-L-5	38029			IBU-L-8	2055		
		*		IBU-L-8	3563			IBU-L-9	2948		
		*		IBU-L-9	2890						
	P4	*		IBU-L-9	1943	IBU-L-9	1419	IBU-L-1	164		
		*		IBU-L-3	26854			IBU-L-2	1866		
		*						IBU-L-9	2028		
	P4	*		IBU-L-9	1716	IBU-L-9	1203	IBU-L-2	1719		
		*						IBU-L-6	3195		
		*						IBU-L-9	1880		
10 µg/L	P5	*		IBU-L-8	4549	IBU-L-9	659				
		*		IBU-L-9	3629						
	P5	*									
	P6	*						IBU-L-5	1765		
		*						IBU-L-6	18098		
		*						IBU-L-7	1365		
		*						IBU-L-9	659		
	P6	*						IBU-L-6	13462		
		*						IBU-L-7	2115		

* Datos no adquiridos por problemas instrumentales.

4.7. CARBAMAZEPINA EN *JUNCUS SP.*

En la tabla 23 se recogen los posibles metabolitos de carbamazepina detectados en las muestras analizadas de *Juncus sp.* a lo largo del ensayo de exposición. Como se puede apreciar, se observa, en términos generales, que el número de metabolitos es mucho mas elevado en las muestras recogidas en el segundo corte, disminuyendo ligeramente en el tercer corte, para volver a aumentar al final del ensayo. Este hecho podría estar relacionado con el estado de la planta en la tercera semana de ensayo ya que, como se ha mencionado anteriormente, la planta comenzó a mostrar un empeoramiento apreciable, que se estabilizó hasta la cuarta semana de ensayo. Como era de esperar, en las plantas expuestas a menores concentraciones de disolución dopante se detectaron más metabolitos al mantenerse la planta en mejores condiciones que aquellas expuestas a mayores concentraciones, que empeoraron de forma más rápida durante el ensayo.

El metabolito CBZ-J 36 aparece con valores de áreas importantes en casi la totalidad de las muestras del tercer corte de la planta, correspondiente a los 21 días de ensayo, produciéndose a la semana siguiente una disminución, lo que sugiere la aparición de nuevos productos de degradación a lo largo del ensayo y que podría estar relacionado con una adaptación de la planta o cambio metabólico producto del estrés sufrido durante el ensayo de exposición.

Sin embargo, los niveles del metabolito CBZ-J 34, correspondiente a una hidroxilación y cuya presencia se aprecia desde los 15 días de exposición, correspondiente a la una hidroxilación, presenta una situación contraria. Se produce un máximo de este metabolito en el segundo corte para disminuir en el tercero y, por último, aumentar en el cuarto corte. Esta ruta metabólica es una de las que más se repite en todas las plantas y niveles, originando mayor cantidad de este metabolito en las plantas expuestas a concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se puede concluir que la generación de este metabolito es proporcional a la concentración de carbamazepina en la solución de riego.

Las demetilaciones se pueden asignar como rutas de producción de los metabolitos CBZ-J 1, CBZ-J 2 y CBZ-J 3, todos con la misma masa teórica pero con distintos tiempos de retención. Aparecen solo en las plantas expuestas a altas concentraciones, en el segundo y cuarto corte y en la raíz, lo que podría indicar que estos metabolitos se producen fundamentalmente a elevadas concentraciones de carbamazepina y en un estado óptimo de la planta; no se detecta a concentraciones en la disolución de riego inferiores a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La pérdida del grupo del fragmento -CHNO conduce al metabolito CBZ-J 6, que se aparece a altas concentraciones de disolución de riego y en todos los cortes, siendo este el producto de degradación que presenta mayores áreas de todos los detectados. La cantidad de este metabolito es también proporcional al tiempo de ensayo, aumentando gradualmente la cantidad del mismo desde la primera semana, hasta los 30 días, alcanzándose áreas del orden de 40000 u.a.

Confirmándose una tendencia similar con los niveles de carbamazepina detectados en *Juncus sp.* (tabla 13) a lo largo del ensayo de exposición a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para las plantas P1 y P2.

Tabla 23. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CBZ-J 9	338	CBZ-J 3	3541/3365			CBZ-J 1	679/526	CBZ-J 11	721
				CBZ-J 2	1467/1948			CBZ-J 4	12787/14204		
				CBZ-J 6	12248			CBZ-J 6	35008/37514		
				CBZ-J 11	288/347			CBZ-J 29	1160		
				CBZ-J 13	2328/2047			CBZ-J 33	239		
				CBZ-J 25	580/572			CBZ-J 34	1787/1665		
				CBZ-J 29	1155/1286			CBZ-J 36	110		
				CBZ-J 30	1305/1262						
				CBZ-J 34	7348/5527						
	P2	CBZ-J 17	91	CBZ-J 1	9162/8806	CBZ-J 36	476/425	CBZ-J 1	552	CBZ-J 3	1414
		CBZ-J 30	70	CBZ-J 2	1441/1775	CBZ-J 34	953/895	CBZ-J 5	7066	CBZ-J 4	5236
				CBZ-J 6	17807			CBZ-J 6	40068	CBZ-J 11	243/547
				CBZ-J 11	348			CBZ-J 12	114	CBZ-J 12	68
				CBZ-J 13	4709/4842			CBZ-J 13	416	CBZ-J 16	103
				CBZ-J 20	219			CBZ-J 15	135	CBZ-J 20	340
				CBZ-J 29	3276			CBZ-J 34	2579/3266	CBZ-J 28	1014
				CBZ-J 34	3776/4740			CBZ-J 36	101	CBZ-J 29	12969/12241
				CBZ-J 35	13381/14176					CBZ-J 34	2677/2474
700 µg/L	P3	CBZ-J 18	228	CBZ-J 21	138	CBZ-J 8	94	CBZ-J 22	11726/12227	CBZ-J 11	127
		CBZ-J 33	781	CBZ-J 24	121	CBZ-J 36	645/643	CBZ-J 32	72	CBZ-J 27	2633
		CBZ-J 40	385/389	CBZ-J 28	116			CBZ-J 36	317	CBZ-J 31	296
		CBZ J 41	129	CBZ-J 29	733						
				CBZ-J 34	3411/3145						
				CBZ-J 35	299						
	P4	CBZ-J 4	127	CBZ-J 3	853/967	CBZ-J 36	495/719	CBZ-J 22	4676	CBZ-J 11	164/152
		CBZ-J 17	81	CBZ-J 29	823			CBZ-J 34	150	CBZ-J 13	164
		CBZ-J 18	86	CBZ-J 30	1009			CBZ-J 36	195	CBZ-J 32	148
		CBZ-J 35	131	CBZ-J 27	2145			CBZ-J 27	305	CBZ-J 34	783
		CBZ-J 37	126	CBZ-J 34	2764/2081						
		CBZ-J 40	254	CBZ-J 35	446/348						
		CBZ-J 41	553								
	P5	CBZ-J 37	113	CBZ-J 4	633	CBZ-J 8	119	CBZ-J 15	259	CBZ-J 7	86
				CBZ-J 5	665	CBZ-J 16	322	CBZ-J 16	110	CBZ-J 26	471
				CBZ-J 10	367	CBZ-J 36	585/592	CBZ-J 34	72	CBZ-J 32	741/787
				CBZ-J 19	295/296			CBZ-J 36	245		
				CBZ-J 35	263			CBZ-J 39	73		
				CBZ-J 38	1158						
10 µg/L	P6	CBZ-J 33	858/633	CBZ-J 4	493/548	CBZ-J 8	117	CBZ-J 16	141	CBZ-J 32	577/643
		CBZ-J 30	63	CBZ-J 19	116	CBZ-J 14	214	CBZ-J 36	237/242	CBZ-J 37	170
				CBZ-J 23	123	CBZ-J 15	420				
						CBZ-J 16	141				
						CBZ-J 32	550/104				
						CBZ-J 34	133				
						CBZ-J 36	514/654				
						CBZ-J 41	104				

4.8. FLUMEQUINA EN *JUNCUS SP.*

En la tabla 24, se muestran los metabolitos de flumequina detectados en muestras procedentes del ensayo de exposición de flumequina sobre *Juncus sp.* Al igual que en el caso de carbamazepina, se detectaron un mayor número de posibles metabolitos, en el segundo corte para concentraciones de exposición medias y altas, no observándose gran número de metabolitos en las muestras procedentes del ensayo a concentración baja, lo que parece guardar relación con el estado de la planta a lo largo del ensayo. También hay que destacar el elevado número de metabolitos detectado en la raíz tras la finalización del ensayo.

El metabolito FMQ-21 aparece repetidamente y con valores de áreas significativos en prácticamente la totalidad de las muestras analizadas procedentes del segundo corte, a los 15 días de ensayo a concentraciones de exposición medias y altas. La ruta metabólica que origina este compuesto corresponde a una hidroxilación y posterior pérdida de un átomo de flúor.

En las muestras del tercer corte, tras 21 días de exposición, aparece FMQ-J 15 con valores de área muy elevados, de forma casi exclusiva, y que corresponde a la ruta que implica una reducción del compuesto original más la pérdida de un átomo de flúor. Con una ruta de degradación muy similar aparece repetidamente FMQ-J 18 en los cortes 2, 4 y en la raíz. Esta ruta metabólica, por tanto, genera los metabolitos con mayores áreas, con lo que podemos decir que es bastante probable aunque no está relacionada con la concentración de flumequina en el agua de riego.

FMQ-J 14, fruto de pérdida de un átomo de flúor, con suma de un átomo de hidrógeno, se produce solo en las plantas expuestas a bajas concentraciones de flumequina.

De igual modo que ocurre con el análisis de carbamazepina en la sección anterior, en el primer corte, realizado tras 7 días de exposición, aparecen un menor número de metabolitos, que presentan valores de área relativamente bajos y que desaparecen en el resto de muestras a medida que el tiempo de exposición aumenta.

Tabla 24. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con flumequina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	FMQ-J 24	90	FMQ-J 6	580			FMQ-J 16	121	FMQ-J 3	339
				FMQ-J 10	325			FMQ-J 18	113/121	FMQ-J 29	1193/913
				FMQ-J 18	103			FMQ-J 29	2387/2722	FMQ-J 36	3901
				FMQ-J 21	3197						
				FMQ-J 22	353						
				FMQ-J 25	15665						
	P2	FMQ-J 17	80	FMQ-J 9	64	FMQ-J 27	304/242	FMQ-J 18	123		
		FMQ-J 24	56	FMQ-J 19	6325/5757			FMQ-J 22	634		
		FMQ-J 30	4817	FMQ-J 21	3651			FMQ-J 28	340		
				FMQ-J 22	967			FMQ-J 29	3161/3734		
700 µg/L	P3	FMQ-J 4	100	FMQ-J 1	2584	FMQ-J 15	80047/37582	FMQ-J 15	33228/34256		
		FMQ-J 17	87	FMQ-J 9	87						
		FMQ-J 37	577	FMQ-J 19	4994						
		FMQ-J 39	123	FMQ-J 20	19764						
				FMQ-J 34	1155						
	P4			FMQ-J 21	5520/5497	FMQ-J 15	37121/73699	FMQ-J 2	91/80	FMQ-J 18	266
				FMQ-J 32	2628/954			FMQ-J 14	159	FMQ-J 26	308
				FMQ-J 34	446			FMQ-J 38	250	FMQ-J 31	91
				FMQ-J 35	997					FMQ-J 36	693
10 µg/L	P5	FMQ-J 14	308/306	FMQ-J 9	261	FMQ-J 16	238	FMQ-J 16	209/206	FMQ-J 9	305/267
		FMQ-J 19	135			FMQ-J 27	348			FMQ-J 13	163
	P6	FMQ-J 6	363	FMQ-J 23	1424	FMQ-J 15	42054			FMQ-J 8	125
		FMQ-J 11	131	FMQ-J 30	875					FMQ-J 14	372
		FMQ-J 14	293							FMQ-J 28	4346
		FMQ-J 37	338							FMQ-J 31	220
										FMQ-J 34	80/120
										FMQ-J 36	1478

4.9. CIPROFLOXACINA EN *JUNCUS SP.*

Los posibles metabolitos de ciprofloxacina detectados en las muestras de *Juncus sp.* sometidas a exposición se recogen en la tabla 25. Hay que destacar el elevado número de metabolitos que aparecen en el primer corte, tras 7 días de exposición, en comparación con CBZ y FMQ disminuyendo progresivamente en el segundo corte y significativamente, al igual que ocurría con otros fármacos, en el tercer corte debido muy probablemente al estado general de la planta, bastante malo a la tercera semana de exposición. Sin embargo, en el cuarto corte, tras 30 días de exposición se aprecia un aumento significativo en el número de metabolitos en todas las plantas y concentraciones de disolución de riego.

Metabolitos asignables a deetilaciones con pérdida de $-C_2H_3N$, códigos CPR-J 7 y CPR-J 8, ambos con la misma fórmula y masa teórica pero con distintos tiempos de retención, lo que supone la misma ruta de degradación pero estructuras diferentes, son los que muestran las mayores áreas en los correspondientes cromatogramas. No obstante, este desaparece en la mayoría de las muestras en el tercer corte y de forma completa en el cuarto corte, probablemente debido a su no formación en plantas con poquísima actividad, y la pérdida del generado previamente. En plantas sometidas a mayores concentraciones parece que aunque el estado de la planta era muy poco satisfactorio, aún permanecía parte de los generados a lo largo del ensayo.

El metabolito CPR-J 16, que corresponde a una doble hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_4H_8N_2$, aparece exclusivamente en el segundo corte, en todas las plantas y a todas las concentraciones. Se deduce que la formación de este producto de degradación depende más del estado de la planta y la acumulación de ciprofloxacina que de la concentración de la misma. A los 15 días de ensayo todas las plantas se encontraban aún en condiciones óptimas.

Las hidroximetilaciones con pérdida de un átomo de oxígeno, con las mismas masas teóricas de 285.1277 y fórmula molecular pero distintos tiempos de retención, generan los posibles metabolitos CPR-J 17, CPR-J 18 y CPR-J 19. Se detectan a todas las concentraciones y en todas las plantas, tanto en el tallo como en la raíz, siendo más abundantes en el segundo corte del tallo de *Juncus sp.*

Por otro lado, la pérdida de un hidroximetileno para generar el metabolito CPR-J 31, parece una vía importante de metabolización de ciprofloxacina ya que el área del pico correspondiente a este metabolito crece con el tiempo en el ensayo de exposición. Este metabolito aparece también en alguna muestra de raíz.

Las dobles hidroxilaciones con pérdida del fragmento $-C_2H_3N$, conducen a los metabolitos CPR-J 48, CPR-J 49 y CPR-J 50, con tiempos de retención 1.56 y 11.53 minutos. Estos productos abundan en las plantas sometidas a bajas concentraciones, encontrándose sobre todo en la primera semana de ensayo. Su formación parece estar relacionada con el equilibrio entre el estado de la planta, al no estar muy afectada en bajas concentraciones, y la concentración de ciprofloxacina; el exceso de exposición a los principios activos parece no favorece la obtención de este metabolito, cambiando la respuesta de la planta, apareciendo nuevos productos de degradación y metabolismo.

Tabla 25. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con ciproflaxacina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CPR-J 7	1052/1229	CPR-J 8	18755/12785			CPR-J 19	195	CPR-J 11	5661
		CPR-J 14	873	CPR-J 16	635/692			CPR-J 25	115	CPR-J 19	189
		CPR-J 21	700	CPR-J 18	5278			CPR-J 31	4819/4225	CPR-J 25	188
		CPR-J 26	1173/1220	CPR-J 31	1348			CPR-J 67	112/111	CPR-J 33	177/288
		CPR-J 30	76/81	CPR-J 35	5375			CPR-J 75	205/199	CPR-J 38	253
		CPR-J 32	2266/2083	CPR-J 46	2487/3495					CPR-J 57	723/566
		CPR-J 36	150	CPR-J 50	462					CPR-J 74	575
		CPR-J 43	110/70	CPR-J 66	300					CPR-J 75	872
		CPR-J 55	438	CPR-J 73	202						
		CPR-J 76	186/213								
	P2	CPR-J 7	2498/2875	CPR-J 8	32032/41864	CPR-J 9	261	CPR-J 19	131/132	CPR-J 19	442
		CPR-J 14	1852/1499	CPR-J 16	735/692	CPR-J 31	1506/2021	CPR-J 31	12866	CPR-J 26	112
		CPR-J 21	592	CPR-J 18	5135/3744	CPR-J 60	921	CPR-J 33	79/78	CPR-J 27	136
		CPR-J 39	382	CPR-J 46	776	CPR-J 8	3658/3408	CPR-J 40	188	CPR-J 42	108
		CPR-J 49	597	CPR-J 44	3695	CPR-J 46	192	CPR-J 45	76/75	CPR-J 57	1532/1419
		CPR-J 56	181	CPR-J 46	4805			CPR-J 55	95/94	CPR-J 72	175/164
				CPR-J 54	1997			CPR-J 57	253	CPR-J 74	1266/1150
				CPR-J 68	362			CPR-J 61	172	CPR-J 75	1063/1229
								CPR-J 75	406/488		
700 µg/L	P3	CPR-J 1	100	CPR-J 16	892/753	CPR-J 6	310	CPR-J 12	869	CPR-J 29	1333
		CPR-J 15	258	CPR-J 19	623/822	CPR-J 31	4396/5892	CPR-J 40	118	CPR-J 31	1759
		CPR-J 19	836/1002	CPR-J 31	809	CPR-J 63	192	CPR-J 44	1150	CPR-J 37	5150/327
		CPR-J 21	625/597					CPR-J 47	137/129	CPR-J 61	370
		CPR-J 23	154					CPR-J 60	1154/948	CPR-J 71	150
		CPR-J 33	172/178								
		CPR-J 36	153								
		CPR-J 41	262								
		CPR-J 43	126								
		CPR-J 50	226								
		CPR-J 55	832/778								
		CPR-J 56	74								
		CPR-J 69	1481/1599								
	P4	CPR-J 3	172	CPR-J 5	2717/3302	CPR-J 73	204	CPR-J 10	60	CPR-J 18	112
		CPR-J 4	125/126	CPR-J 8	3201			CPR-J 13	243/314	CPR-J 49	176
		CPR-J 30	100	CPR-J 16	1263/1181			CPR-J 22	221	CPR-J 60	408
		CPR-J 33	286	CPR-J 18	4797			CPR-J 31	8256		
		CPR-J 34	295	CPR-J 46	504			CPR-J 60	248		
		CPR-J 45	149	CPR-J 59	1100/741						
		CPR-J 49	2285								
		CPR-J 53	389/428								
		CPR-J 67	477								
		CPR-J 73	90								
		CPR-J 75	186								
		CPR-J 14	1742	CPR-J 8	1672	CPR-J 9	91	CPR-J 13	118	CPR-J 17	136
		CPR-J 15	129	CPR-J 16	1121/772	CPR-J 18	329	CPR-J 31	10960	CPR-J 47	95
		CPR-J 31	694	CPR-J 42	1232	CPR-J 44	318	CPR-J 42	158	CPR-J 70	99/137
10 µg/L	P5	CPR-J 33	96	CPR-J 50	322	CPR-J 48	134	CPR-J 44	382	CPR-J 73	84
		CPR-J 35	566/458	CPR-J 54	395	CPR-J 49	130	CPR-J 48	94		
		CPR-J 36	241	CPR-J 59	1544	CPR-J 63	381	CPR-J 51	155		
		CPR-J 41	218	CPR-J 64	265	CPR-J 66	70	CPR-J 52	102		
		CPR-J 49	1718	CPR-J 71	1770			CPR-J 63	130		
		CPR-J 50	268					CPR-J 67	103		
		CPR-J 58	85								
		CPR-J 3	130	CPR-J 16	1024/953	CPR-J 44	1145	CPR-J 2	216	CPR-J 6	103
		CPR-J 26	250	CPR-J 19	196	CPR-J 50	68	CPR-J 54	93	CPR-J 18	117
	P6	CPR-J 43	64	CPR-J 71	1404	CPR-J 56	357	CPR-J 12	622	CPR-J 28	120
		CPR-J 50	481			CPR-J 65	110			CPR-J 29	120
		CPR-J 62	77			CPR-J 60	1009			CPR-J 32	132
						CPR-J 65	8.81			CPR-J 37	689
										CPR-J 39	94
										CPR-J 58	726
										CPR-J 66	149

4.10. ENROFLOXACINA EN *JUNCUS SP.*

La cantidad de metabolitos de enrofloxacin en *Juncus sp.* sometido al ensayo de exposición (tabla 26), vuelve a ser considerable en el primer y segundo corte y disminuye de modo relevante, al igual que en los casos anteriores con otros principios activos, en el tercer corte del tallo de la planta, correspondiente a los 21 días de ensayo de exposición, posiblemente por el estado tan malo que presentaba la planta en la tercera semana. Aunque aparentemente el número de metabolitos parece aumentar significativamente en el cuarto corte, las áreas de los picos analizados son muy bajas, por lo que realmente esto resulta coherente con un mal estado de la planta en este punto del ensayo.

La ruta metabólica procedente de una desmetilación con pérdida del grupo $-C_4H_7N$ (ENR-J 16) predomina en el primer corte del tallo de la planta, alcanzando elevadas acumulaciones tanto en la muestra como en su réplica. El metabolito ENR-J 13 generado a partir de una desetilación con pérdida del grupo $-C_4H_7N$, aparece con valores de área importantes en las muestras de raíz dopadas a elevadas concentraciones de disolución de distintos principios activos.

Por otro lado se observa la abundancia en la raíz de las plantas sometidas a altas concentraciones del metabolito ENR-J 75 correspondiente a una acetilación con pérdida del grupo $-C_2H_4$, el cual también se encuentra en las muestras de tallo del cuarto corte expuestas a altas concentraciones P2, así como en muchos de los tallos de *Juncus sp.* de la primera semana de ensayo, tanto en altas, intermedias como bajas concentraciones de disolución dopante.

En la tercera semana de ensayo, predomina la formación del metabolito ENR-J 29 proveniente una desetilación con pérdida de un átomo de oxígeno, originándose también en las muestras de tallo de la primera semana, así como en las muestras de raíz de las plantas.

El metabolito ENR-J 74 procedente de la pérdida de un átomo de oxígeno y posterior formación del aducto sodiado, se halló en las muestras de tallo analizadas a los 15 días del ensayo de exposición. Este se formó en la raíz de las plantas sometidas tanto a altas como intermedias concentraciones de disolución dopante P2 y P4, ya que aparecen residuos en dicha raíz en bajas cantidades. Su presencia desaparece a medida que aumenta el tiempo de exposición.

ENR-J 77 procedente de una hidroxilación, aparece en muestras de tallo expuestas a concentraciones de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ analizadas a los 15 días del ensayo de exposición, mostrando valores de área bastante altos, disminuyendo en las semanas posteriores en las muestras P2 y P3 y desapareciendo en el resto. A bajas concentraciones dicho metabolito aparece en la raíz, lo que podría explicar su ausencia en el tallo a esta concentración.

Tabla 26. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacin.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	ENR-J 8	162	ENR-J 16	31158			ENR-J 30	97	ENR-J 1	1624
		ENR-J 13	1229/1052	ENR-J 18	412			ENR-J 48	136	ENR-J 13	40982
		ENR-J 21	12791/11861	ENR-J 44	183					ENR-J 44	147
		ENR-J 29	111	ENR-J 74	689					ENR-J 48	370
		ENR-J 51	1528/1641	ENR-J 78	184					ENR-J 66	120
		ENR-J 60	134							ENR-J 74	85/92
										ENR-J 75	873/780
										ENR-J 81	139
	P2	ENR-J 12	526	ENR-J 10	263	ENR-J 4	311	ENR-J 42	95	ENR-J 13	48477/50395
		ENR-J 13	2498/2876	ENR-J 23	633	ENR-J 19	1506/2022	ENR-J 48	90	ENR-J 29	1803
		ENR-J 16	9377/9039	ENR-J 31	211	ENR-J 49	90	ENR-J 61	92	ENR-J 40	179
		ENR-J 25	2616	ENR-J 55	537/470	ENR-J 77	995	ENR-J 75	488	ENR-J 48	227
		ENR-J 41	682/750	ENR-J 49	445					ENR-J 52	90
		ENR-J 42	585/467	ENR-J 61	316					ENR-J 63	92
		ENR-J 59	930	ENR-J 74	1691					ENR-J 66	85
		ENR-J 61	386	ENR-J 77	13557/10691					ENR-J 74	90
700 µg/L	P3	ENR-J 62	718							ENR-J 75	1266/1229
		ENR-J 75	277								
		ENR-J 7	113	ENR-J 18	1018	ENR-J 19	4396	ENR-J 21	156	ENR-J 1	285
		ENR-J 16	14771/15661	ENR-J 34	289			ENR-J 33	200	ENR-J 26	207
		ENR-J 18	366/326	ENR-J 44	164			ENR-J 39	95	ENR-J 32	731
		ENR-J 22	153	ENR-J 66	750			ENR-J 70	92	ENR-J 49	102
		ENR-J 29	126	ENR-J 74	1080/843			ENR-J 77	233	ENR-J 52	164
		ENR-J 32	489	ENR-J 77	3985/3230					ENR-J 63	515
		ENR-J 33	94							ENR-J 80	5239
		ENR-J 40	273								
		ENR-J 50	91								
		ENR-J 61	607/583								
		ENR-J 69	97								
		ENR-J 70	329								
		ENR-J 78	318								
	P4	ENR-J 10	127	ENR-J 19	872	ENR-J 29	1539/1647	ENR-J 15	315/244	ENR-J 4	208
		ENR-J 11	950	ENR-J 36	5932			ENR-J 21	98	ENR-J 27	95
		ENR-J 16	11848/10704	ENR-J 43	740			ENR-J 27	92	ENR-J 35	78
		ENR-J 17	704	ENR-J 61	583			ENR-J 35	94	ENR-J 45	101
		ENR-J 18	237/256	ENR-J 74	434			ENR-J 38	171	ENR-J 52	1750
		ENR-J 32	363	ENR-J 77	4580			ENR-J 49	90	ENR-J 54	192
		ENR-J 41	712/680	ENR-J 78	201			ENR-J 52	98	ENR-J 56	516
		ENR-J 47	246	ENR-J 83	357			ENR-J 66	98	ENR-J 73	285
		ENR-J 61	1438	ENR-J 81	509			ENR-J 78	94	ENR-J 74	92
		ENR-J 63	812							ENR-J 78	150
		ENR-J 70	116/183							ENR-J 79	80
		ENR-J 75	186/265							ENR-J 81	309
		ENR-J 76	351							ENR-J 84	98
	P5	ENR-J 14	2079	ENR-J 13	813			ENR-J 4	98	ENR-J 1	142
		ENR-J 19	694/559	ENR-J 18	534			ENR-J 15	120	ENR-J 2	141
		ENR-J 27	218	ENR-J 23	995			ENR-J 57	99	ENR-J 4	162
		ENR-J 34	269	ENR-J 34	151			ENR-J 61	91	ENR-J 23	436
		ENR-J 41	350	ENR-J 42	494			ENR-J 79	108	ENR-J 37	87
		ENR-J 42	118	ENR-J 54	1626					ENR-J 38	287
		ENR-J 46	95	ENR-J 55	738					ENR-J 49	122
		ENR-J 58	98	ENR-J 57	745					ENR-J 53	327
		ENR-J 75	862	ENR-J 61	533/744					ENR-J 67	116
		ENR-J 82	1746	ENR-J 63	708					ENR-J 71	111
				ENR-J 68	335/450						
				ENR-J 74	735						
				ENR-J 81	445						
				ENR-J 83	605						
10 µg/L	P6	ENR-J 8	150	ENR-J 44	1307	ENR-J 2	250	ENR-J 2	176	ENR-J 3	285
		ENR-J 9	130			ENR-J 29	1385	ENR-J 18	95	ENR-J 4	392
		ENR-J 16	8510/7526			ENR-J 35	423	ENR-J 20	193	ENR-J 5	112
		ENR-J 21	2029/2016					ENR-J 28	82	ENR-J 21	132
		ENR-J 24	277					ENR-J 42	97	ENR-J 26	337
		ENR-J 27	235					ENR-J 48	157	ENR-J 28	256
		ENR-J 34	482					ENR-J 49	90	ENR-J 30	400
		ENR-J 51	594					ENR-J 61	108/93	ENR-J 32	127
		ENR-J 61	369/202					ENR-J 79	278	ENR-J 35	102
		ENR-J 70	220					ENR-J 80	162	ENR-J 45	117
		ENR-J 71	397							ENR-J 49	394/452
										ENR-J 65	99
										ENR-J 70	100/210
										ENR-J 72	90
										ENR-J 76	277
										ENR-J 77	1837/928

4.11. DICLOFENACO EN *JUNCUS SP.*

En la tabla 27, se recogen los posibles metabolitos obtenidos en las plantas de *Juncus sp.* expuestas al ensayo de exposición, se observa a simple vista mayor cantidad de metabolitos en el tallo de las plantas regadas a bajas concentraciones de disolución dopante. No obstante, la situación se invierte en la raíz, ya que al final del ensayo, es en las plantas regadas con disolución de mayor concentración, donde se identifican un mayor número de metabolitos. Es significativo el hecho de no haber detectado ningún posible metabolito en el primer corte de las plantas regadas con disolución de alta concentración de diclofenaco, así como un solo compuesto en el tercer corte de estas mismas plantas.

El metabolito procedente de la molécula padre, con una pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$ (DCL-J 7) se identifica en el primer corte del tallo a intermedias y bajas concentraciones, en el segundo corte del tallo, a concentraciones intermedias (P4) en el tercer corte a todas las concentraciones, y en la raíz de las plantas regadas con disolución de alta concentración de diclofenaco.

En el segundo corte del tallo de la planta, se encuentran, en todas las concentraciones y tanto en la muestra como en su réplica, los metabolitos DCL-J 19 y DCL-J 25, este último también aparece en el primer corte de una de las plantas regadas a baja concentración. Estos metabolitos se corresponden con el correspondiente compuesto sodiado tras la pérdida del fragmento $-C_6H_2Cl_2$ y a una doble hidroxilación con pérdida de un fragmento $-C_6H_2Cl_2$, respectivamente. Los picos cromatográficos correspondientes a DCL-J 25 llegan a alcanzar áreas de más de 16000 u.a.

La ruta metabólica de acetilación con pérdida del fragmento $-C_6H_2Cl_2$ origina el metabolito DCL-J 26, con una masa teórica de 193.0739 m/z y a un tiempo de retención de 3.27 minutos. Este metabolito se ha identificado en plantas regadas con disoluciones de concentración baja e intermedia en el tercer corte del tallo y, a todas las concentraciones, en el último corte del ensayo.

El metabolito DCL-J 30, correspondiente a una desetilación con pérdida de un átomo de cloro y adición de un átomo de hidrógeno, ha sido identificado en el primer corte de plantas regadas con disoluciones de concentración baja e intermedia, así como en la raíz de la planta P6, regada con disolución de baja concentración. Por otro lado, se identifica un posible metabolito (DCL-J 45), con un tiempo de retención de 11.07 minutos, procedente de una hidroxilación formado a partir de los 21 días de ensayo en las plantas regadas a concentraciones intermedias. Este mismo posible metabolito ha sido detectado en el último corte y en la raíz de las plantas regadas con disoluciones de alta y media concentración.

Es significativa la presencia del posible metabolito DCL-J 42 en la raíz de las plantas tras el ensayo de exposición. Este compuesto procede de una desmetilación, y alcanza picos cromatográficos con área de hasta 42000 u.a. en las plantas regadas con disolución de alta concentración. Se ha identificado también, aunque en menor cantidad, en tallos del último corte de plantas regadas con alta concentración de diclofenaco.

Tabla 27. Posibles metabolitos encontrados en muestras de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1			DCL-J 2	2456			DCL-J 32	94	DCL-J 1	975/699
				DCL-J 19	8202			DCL-J 36	57	DCL-J 7	435/549
				DCL-J 25	7621			DCL-J 42	461/437	DCL-J 14	1258/722
				DCL-J 8	6723/5983			DCL-J 45	2899/2789	DCL-J 16	1312/975
				DCL-J 15	149					DCL-J 38	62495
				DCL-J 29	231/168					DCL-J 42	860
				DCL-J 44	117					DCL-J 45	3298/1751
	P2			DCL-J 2	2209/2101	DCL-J 7	66	DCL-J 1	1512/1525	DCL-J 1	1090/964
				DCL-J 8	5207			DCL-J 12	415/393	DCL-J 2	1557/1612
				DCL-J 19	2555			DCL-J 26	943	DCL-J 3	1049
				DCL-J 16	1077/1035			DCL-J 45	8677/8499	DCL-J 4	261
				DCL-J 25	12167/10739					DCL-J 6	198
				DCL-J 28	1298					DCL-J 14	1131/1206
				DCL-J 29	361/304					DCL-J 16	1611/1596
				DCL-J 34	242/284					DCL-J 17	164
				DCL-J 45	10580					DCL-J 31	339
										DCL-J 39	86
										DCL-J 42	4200/3979
										DCL-J 45	5534
700 µg/L	P3	DCL-J 30	114	DCL-J 2	3260/3449	DCL-J 41	100/101	DCL-J 10	181	DCL-J 1	616/353
		DCL-J 37	60/40	DCL-J 19	1884/1519	DCL-J 45	95	DCL-J 12	1535/1709	DCL-J 16	934/634
				DCL-J 25	16733/16467	DCL-J 6	61/66	DCL-J 26	14621/14210	DCL-J 18	913
				DCL-J 28	1025/966	DCL-J 7	174/153	DCL-J 28	117	DCL-J 42	284/397
						DCL-J 27	1347	DCL-J 45	239	DCL-J 15	151
										DCL-J 4	97
										DCL-J 45	5029
	P4									DCL-J 14	207
		DCL-J 30	218	DCL-J 7	2642/2371	DCL-J 15	65/77	DCL-J 9	173/1026	DCL-J 4	242/382
		DCL-J 7	2643/2371	DCL-J 19	1979/5521	DCL-J 17	1248	DCL-J 26	768/1837	DCL-J 5	779/754
		DCL-J 21	812	DCL-J 25	4639/14793	DCL-J 26	4404	DCL-J 39	57	DCL-J 15	177/187
		DCL-J 22	1979/1884	DCL-J 8	10938	DCL-J 40	155	DCL-J 45	326/259	DCL-J 42	391/406
		DCL-J 23	286	DCL-J 12	4662	DCL-J 45	110				
		DCL-J 38	207	DCL-J 20	13061	DCL-J 7	241/199				
				DCL-J 28	1079	DCL-J 13	36				
				DCL-J 35	3239	DCL-J 22	76/60				
10 µg/L	P5	DCL-J 30	179	DCL-J 5	3158/3030	DCL-J 15	83	DCL-J 9	864/951	DCL-J 15	112/114
		DCL-J 39	127	DCL-J 19	9133/9084	DCL-J 16	1102/878	DCL-J 12	733/647	DCL-J 5	1096/1662
		DCL-J 7	2779/2674	DCL-J 25	13574/14387	DCL-J 26	416	DCL-J 16	222		
		DCL-J 23	280/264	DCL-J 7	5174/4978	DCL-J 33	56	DCL-J 26	1160/1098		
		DCL-J 46	145	DCL-J 8	7496/7500	DCL-J 7	175/303	DCL-J 33	50		
		DCL-J 25	13573	DCL-J 34	187/167	DCL-J 19	87				
		DCL-J 20	9084	DCL-J 35	5035/4191						
	P6			DCL-J 43	1716						
		DCL-J 30	193	DCL-J 34	342/319	DCL-J 15	72	DCL-J 12	1080/1116	DCL-J 15	248/206
		DCL-J 7	2355/2682	DCL-J 35	4089	DCL-J 26	960	DCL-J 26	1097/973	DCL-J 4	220
		DCL-J 22	1512	DCL-J 43	2092	DCL-J 39	116/92	DCL-J 39	104/69	DCL-J 5	988
		DCL-J 23	272			DCL-J 7	238/184	DCL-J 17	50	DCL-J 30	128
								DCL-J 11	30	DCL-J 23	1175

4.12. IBUPROFENO EN *JUNCUS SP.*

En la tabla 28, se recogen los posibles metabolitos obtenidos del ensayo de exposición de *Juncus sp.* con el principio activo ibuprofeno, a simple vista se observa la escasez de metabolitos en comparación con los otros principios activos en la misma planta, esto es debido a que la mayoría de los metabolitos adquiridos se encuentran o en el control o en el blanco de las muestras, tanto en la matriz del tallo de la planta como de la raíz.

En metabolito IBU-J 4, procedente de una hidroxilación, se genera tanto en la raíz, como en el tallo, aunque la ruta metabólica que implica la pérdida de un hidroximetileno, formando el metabolito IBU-J 1, es el más abundante en el tallo de *Juncus sp.* encontrándolo en la muestra y en su réplica con unas unidades de área del mismo orden de magnitud.

Tabla 28. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Corte 4		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1			IBU-J 1	817/775					IBU-J 4	61/75
										IBU-J 2	22
	P2			IBU-J 1	2013/2166					IBU-J 2	144/157
				IBU-J 4	3737					IBU-J 4	87/89
700 µg/L	P3			IBU-J 1	543						
				IBU-J 3	1411/1343						
	P4										
10 µg/L	P5										
	P6										

4.13. CARBAMAZEPINA EN *SALICORNIA EUROPAEA*

En la siguiente tabla, se recogen los posibles metabolitos de carbamazepina formados en *Salicornia eu.* al ser sometida a los ensayos de exposición. Se aprecia como es la raíz de la planta, analizada al final del ensayo, la parte donde se ha obtenido el mayor número de metabolitos, siendo, además, más abundantes en las plantas expuestas a bajas concentraciones (P5 y P6) que en las plantas sometidas a concentraciones elevadas.

En los tallos de las plantas expuestas a altas concentraciones no se detectó prácticamente ningún producto secundario, encontrándose metabolitos en las plantas sometidas a una disolución de riego de 700 µg·L⁻¹. Probablemente, las altas concentraciones, que favorecieron el

empeoramiento de las plantas, son las responsables de la carencia de metabolitos, y la pérdida de actividad biológica esté directamente relacionada con la ausencia de metabolitos.

Al disminuir la concentración de las disoluciones de riego aumenta la cantidad de metabolitos, alcanzando su máximo en la planta P4, para después volver a disminuir a bajas concentraciones, quizás debido a la carencia de principio activo, al no observarse tampoco acumulaciones de carbamazepina en las plantas P5 y P6 (tabla 29). Sin embargo, a medida que aumentan las semanas del ensayo, aumenta la cantidad de metabolitos, adquiriendo su máximo número en el tercer corte del ensayo.

El hecho de que el metabolito CBZ-S 14 aparezca en todas las muestras de raíz, independientemente de la concentración de la disolución de riego, parece evidenciar que, o bien parte de la carbamazepina suministrada queda en forma de residuo sufriendo la ruta metabólica consistente en una acetilación con pérdida del grupo –HN, o bien este metabolito formado en la raíz no se absorbe hacia la planta.

El metabolito más abundante en el primer corte del tallo es CBZ-S 11, alcanzando áreas de 600 u.a. y correspondiente a una ruta metabólica de hidratación con pérdida de un grupo –HN.

A los 15 días del ensayo, el metabolito CBZ-S 3, correspondiente a la pérdida del fragmento –CHNO, se detectó en las plantas P3 a P6, es decir, a concentraciones medias y bajas de carbamazepina, aumentando la cantidad al disminuir la concentración de la disolución de riego. En la última semana predominó la ruta metabólica de sodiado con pérdida del grupo CBZ-S 8, que corresponde a mismo metabolito CBZ-S 3 como aducto sodiado, y que aparece en dos de las seis plantas analizadas, P3 y P5.

Ninguna de las rutas metabólicas más frecuentes se mantiene de forma continua en los distintos cortes o en la raíz, salvo el metabolito CBZ-S 9, cuya formación parece disminuir a medida que aumenta el tiempo de ensayo, con lo que la formación de metabolitos de carbamazepina en *Salicornia eu.* parece estar más relacionada con el estado de la planta que con la concentración de la disolución de riego o tiempo de ensayo.

Tabla 29. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con carbamazepina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CBZ-S 11	98						
	P1	CBZ-S 11	90						
	P1								
	P2							CBZ-S 1	77
	P2							CBZ-S 6	98
								CBZ-S 12	153
	P2							CBZ-S 14	94
700 µg/L	P3	CBZ-S 15	197	CBZ-S 3	141	CBZ-S 8	340	CBZ-S 14	70
	P3							CBZ-S 14	93
	P3								
	P4	CBZ-S 11	315	CBZ-S 3	176	CBZ-S 13	878	CBZ-S 13	330
	P4	CBZ-S 11	617	CBZ-S 9	337	CBZ-S 9	217	CBZ-S 13	347
	P4	CBZ-S 2	77	CBZ-S 3	757			CBZ-S 14	82
10 µg/L	P5	CBZ-S 9	911	CBZ-S 4	570	CBZ-S 8	656	CBZ-S 14	86
				CBZ-S 3	1051	CBZ-S 10	235		
	P5					CBZ-S 8	260		
	P5					CBZ-S 12	1073		
						CBZ-S 8	186		
	P6			CBZ-S 3	1776	CBZ-S 10	150	CBZ-S 13	127
	P6							CBZ-S 13	78
	P6							CBZ-S 3	75
								CBZ-S 5	60
							CBZ-S 14	100	

4.14. FLUMEQUINA EN *SALICORNIA EUROPAEA*

En la tabla siguiente, se muestran los posibles metabolitos detectados en el tallo y raíz de *Salicornia eu.* al ser sometida a los ensayos de exposición con disoluciones de riego conteniendo flumequina. Se observa como, a medida que el tiempo del ensayo evoluciona, aumentó la cantidad de metabolitos, obteniendo el número máximo al final del ensayo a los 21 días, como se apreció también con CBZ. Esto puede estar relacionado, bien con el estado general de la planta, o lo mas probable con la absorción de FMQ por parte de la planta, parece que inicialmente la planta absorbe el principio activo tal cual, sin que las concentraciones de FMQ en la planta produzcan respuesta metabolica alguna sobre FMQ, hasta que en un determinado momento, en la planta se producen procesos de metabolización. Podría también considerarse que las diferentes rutas metabólicas sean

relativamente lentas, apareciendo los diferentes metabolitos de forma paulatina a lo largo del ensayo. Esta situación es similar a la observada con carbamazepina como sustancia activa.

La ruta metabólica con pérdida de un átomo de flúor y adición de un átomo de hidrógeno, conduce a los metabolitos FMQ-S 5 y FMQ-S 6, con tiempos de retención de 5.16 y 9.64 minutos, respectivamente. Aparecen a todas las concentraciones en el tercer corte del tallo de la planta, en mayor medida FMQ-S 5 para las concentraciones más elevadas. En las plantas expuestas a $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, la cantidad de FMQ-S 6 alcanza 800 u.a.; siendo por ello más probable esta ruta metabólica a concentraciones intermedias al encontrarse la planta en mejores condiciones.

A diferencia de los metabolitos obtenidos de la carbamazepina, los correspondientes de flumequina apenas aparecen en la raíz de la planta, lo que parece indicar un metabolismo radicalmente diferente para ambos fármacos.

Tabla 30. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con flumequina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1					FMQ-S 3	102		
						FMQ-S 5	92		
	P1					FMQ-S 5	128		
	P1								
	P2					FMQ-S 1	73	FMQ-S 6	115
	P2								
700 µg/L	P3					FMQ-S 6	184	FMQ-S 12	69
	P3								
	P3					FMQ-S 6	250		
						FMQ-S 8	217		
	P4			FMQ-S 2	88	FMQ-S 6	533		
						FMQ-S 13	732		
	P4			FMQ-S 9	85	FMQ-S 6	789		
						FMQ-S 7	342		
	P4			FMQ-S 8	751	FMQ-S 6	800		
				FMQ-S 10	62	FMQ-S 4	101		
						FMQ-S 15	233		
10 µg/L	P5	FMQ-S 11	394	FMQ-S 13	845	FMQ-S 7	264		
	P5			FMQ-S 4	162	FMQ-S 13	554		
	P5								
	P6							FMQ-S 12	92
	P6							FMQ-S 12	111
	P6					FMQ-S 10	572		
						FMQ-S 13	501		
						FMQ-S 14	1273		

4.15. CIPROFLOXACINA EN *SALICORNIA EUROPAEA*

En la tabla 31 se muestran los posibles metabolitos obtenidos en tallo y raíz de las plantas de *Salicornia eu.* sometidas al ensayo con disoluciones de riego conteniendo ciprofloxacina. Se observa como en la raíz se forma, independientemente de la concentración en la disolución de riego, el metabolito CPR-S 30, producto de una doble hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_2H_2$, por lo que esta ruta metabólica parece estar intimamente ligada a la raíz de la planta.

En los tallos del primer y tercer corte aparece el metabolito CPR-S 29, correspondiente a una ruta metabólica que implica la pérdida de un átomo de flúor y formación de un aducto sodiado,

siendo más significativa en las plantas P3 y P4 que fueron regadas a concentraciones de disolución dopante de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La ruta metabólica “formación del aducto sodiado con pérdida de un átomo de oxígeno” conduce a la formación del metabolito CPR-S 31, que es el más común a los 15 días de exposición de la planta (segundo corte) apareciendo en todas las plantas salvo en las plantas regadas con la disolución diluida ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Su formación parece estar ligada con la concentración de la disolución de riego y con el tiempo de asimilación del fármaco por parte de la planta. Se detectaron valores del área de metabolito del mismo orden para concentraciones altas e intermedias, y solo en este corte.

En el primer corte del tallo, a la semana del ensayo, predominan más los metabolitos en las plantas P5 expuestas a disoluciones con bajas concentraciones de ciprofloxacina. El metabolito CPR-S 17, correspondiente a una hidratación con pérdida del grupo $-\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, y que solo aparece en este corte, parece indicar que esta ruta metabólica solo ocurre en los primeros estadios de exposición.

Las plantas P3 y P4, expuestas a concentraciones intermedias, son las que tuvieron mayor cantidad de metabolitos tanto en los tallos, a lo largo del ensayo, como en la raíz. Es probable que el equilibrio entre concentración de disolución de riego y estado de la planta haya condicionado el metabolismo global de ciprofloxacina.

Tabla 31. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con ciprofloxacina.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	CPR-S 6	83	CPR-S 31	298	CPR-S 1	489		
		CPR-S 31	172			CPR-S 29	290		
	P1	CPR-S 2	70	CPR-S 31	315	CPR-S 11	78		
		CPR-S 23	120						
	P1	CPR-S 5	155						
		CPR-S 7	75						
	P2	CPR-S 7	67			CPR-S 5	325	CPR-S 30	1965
						CPR-S 16	2797		
	P2	CPR-S 3	68	CPR-S 31	259	CPR-S 5	358		
		CPR-S 4	90			CPR-S 11	207		
		CPR-S 7	79			CPR-S 14	162		
						CPR-S 15	114		
						CPR-S 16	3236		
	P2					CPR-S 29	198		
				CPR-S 31	289				
700 µg/L	P3	CPR-S 7	82	CPR-S 31	352	CPR-S 29	571	CPR-S 27	87
				CPR-S 22	70				
	P3					CPR-S 1	330	CPR-S 27	90
						CPR-S 29	327		
	P3							CPR-S 10	75
	P4	CPR-S 15	99	CPR-S 1	416	CPR-S 1	262	CPR-S 10	62
		CPR-S 21	249			CPR-S 5	128	CPR-S 30	1304
		CPR-S 29	150			CPR-S 20	170		
	P4	CPR-S 5	95	CPR-S 1	253	CPR-S 1	283	CPR-S 30	2213
		CPR-S 29	247	CPR-S 31	274	CPR-S 29	322		
	P4	CPR-S 6	96	CPR-S 1	237	CPR-S 14	385	CPR-S 10	70
		CPR-S 15	164	CPR-S 31	386	CPR-S 29	202	CPR-S 30	2959
		CPR-S 29	530						
10 µg/L	P5	CPR-S 8	366		7142	CPR-S 24	152	CPR-S 12	420
		CPR-S 9	330	CPR-S 20	734			CPR-S 30	1258
		CPR-S 5	6202	CPR-S 25	1088				
		CPR-S 17	335	CPR-S 17	613				
		CPR-S 19	4773	CPR-S 9	358				
		CPR-S 32	1763						
	P5	CPR-S 5	973	CPR-S 7	4582				
		CPR-S 17	249						
		CPR-S 32	2768						
	P5	CPR-S 16	958	CPR-S 7	3066			CPR-S 12	522
		CPR-S 17	247	CPR-S 28	793			CPR-S 30	1673
		CPR-S 26	2339	CPR-S 22	622				
		CPR-S 32	2058						
	P6							CPR-S 12	1556
								CPR-S 30	5937
	P6							CPR-S 12	1673
								CPR-S 30	6726
	P6							CPR-S 12	1831
								CPR-S 18	77
	P6							CPR-S 30	6781

4.16. ENROFLOXACINA EN *SALICORNIA EUROPAEA*

La tabla 32, recoge los posibles metabolitos de enrofloxacin obtenidos en el tallo y raíz de las plantas de *Salicornia eu.*, se observa como la cantidad de metabolitos aumenta al aumentar el tiempo del ensayo de exposición, obteniéndose en el tallo de la planta del tercer corte, correspondiente a los 21 días de ensayo, más cantidad de metabolitos que al comienzo del ensayo.

El metabolito ENR-S 3 correspondiente a una doble hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_{13}H_8NO_3F$, aparece indistintamente en muchas de las plantas analizadas, aunque no se aprecia ninguna correlación entre su presencia y el nivel de concentración al que se expusieron las plantas ni con el tiempo de exposición.

Se genera en todos los cortes del tallo de la *Salicornia eu.* indistintamente de la concentración de la disolución, el metabolito procedente de la ruta metabólica de deshidratación de alcoholes con pérdida del fragmento $-C_4H_7N$, (ENR-J 6) siendo más abundante en el tercer corte del tallo.

El metabolito ENR-J 28 proveniente de una hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_2H_4$ se origina sobre todo en el primer corte del tallo, durante la primera semana del ensayo de exposición y en el segundo corte del tallo en la planta P2, expuesta a altas concentraciones de disolución dopante de analitos.

Por otro lado se forma el metabolito ENR-S 27, de fórmula empírica $C_{19}H_{24}FN_3O_2$, únicamente en el tercer corte del tallo sobre todo en las plantas que fueron regadas con altas concentraciones de disolución dopante, no encontrándose en las plantas expuestas a bajas concentraciones.

En las muestras de la raíz de la *Salicornia eu.* tan solo aparecen los metabolitos en las plantas P6 y P2, sometidas a concentraciones de disoluciones dopantes de $10 \mu g \cdot L^{-1}$ y $10 mg \cdot L^{-1}$ respectivamente, no encontrándose prácticamente en ninguna otra raíz de las plantas metabolitos. Este hecho podría indicar que la mayoría de los procesos que sufre ENR suceden en el tallo de la planta por su fácil absorción y asimilación por parte de la planta.

Al igual que en el caso de los posibles metabolitos de flumequina encontrados en las muestras de *Salicornia eu.*, no se encuentran metabolitos en las muestras de tallo a altas concentraciones de disoluciones dopantes (en ninguna de las plantas P1, ni P2).

Tabla 32. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con enrofloxacin.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1					ENR-S 27	704/651		
	P1					ENR-S 15	114		
	P1					ENR-S 27	177		
	P1					ENR-S 2	149		
	P2			ENR-S 1	654	ENR-S 6	358	ENR-S 3	235
				ENR-S 3	215	ENR-S 9	338	ENR-S 38	42
				ENR-S 34	198	ENR-S 10	207		
						ENR-S 13	3236		
	P2					ENR-S 27	312		
				ENR-S 28	702	ENR-S 6	325	ENR-S 26	33
						ENR-S 13	2798		
700 µg/L	P3	ENR-S 5	2066	ENR-S 31	424	ENR-S 32	142	ENR-S 25	102
		ENR-S 28	572						
		ENR-S 31	476						
	P3								
	P3								
	P4	ENR-S 3	163	ENR-S 6	183	ENR-S 6	1184		
		ENR-S 12	164	ENR-S 3	246	ENR-S 14	405		
		ENR-S 29	78	ENR-S 14	153				
	P4	ENR-S 28	396	ENR-S 13	996	ENR-S 13	101		
				ENR-S 18	100	ENR-S 30	72		
	P4			ENR-S 35	925	ENR-S 3	74		
				ENR-S 17	564	ENR-S 27	355/409		
10 µg/L	P5	ENR-S 5	362	ENR-S 14	377	ENR-S 20	645		
		ENR-S 28	2768	ENR-S 20	1636	ENR-S 21	606		
		ENR-S 32	2019	ENR-S 37	911				
	P5	ENR-S 4	97	ENR-S 14	613				
		ENR-S 5	836	ENR-S 7	179				
		ENR-S 8	545	ENR-S 23	1088				
		ENR-S 28	2401	ENR-S 37	919				
	P5	ENR-S 5	4751/1492						
		ENR-S 6	6202/973						
		ENR-S 16	4773						
		ENR-S 28	1763/2059						
		ENR-S 14	250						
	P6			ENR-S 32	2607	ENR-S 22	3095	ENR-S 24	166
				ENR-S 35	890	ENR-S 26	693		
						ENR-S 37	422		
	P6							ENR-S 36	122
	P6							ENR-S 11	335
								ENR-S 19	247

4.17. DICLOFENACO EN *SALICORNIA EUROPAEA*

En la siguiente tabla se recogen los posibles metabolitos de diclofenaco encontrados en muestras de *Salicornia eu.* A simple vista se observa un mayor número de metabolitos en el tercer corte del tallo de la planta correspondiente a la tercera semana, 21 días, de forma generalizada en todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, la planta P4 a concentraciones intermedias presenta gran número de metabolitos en casi todas las muestras analizadas, mostrando valores de áreas importantes en muchos de las señales obtenidas.

El metabolito procedente de una desmetilación con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$, correspondiente a DCL-S 6, se repite sobre todo a concentraciones intermedias y bajas en el tercer corte del tallo y en la raíz de la planta, encontrándose en todas las plantas dopadas a esas concentraciones en órdenes de magnitud similares para cada concentración de ensayo analizada. Cabe también destacar que no aparece en ninguna de las muestras de alta concentración analizadas.

La ruta metabólica de deshidratación de alcoholes con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$ origina los metabolitos DCL-S 3, DCL-S 4 y DCL-S 5, que aparecen de forma reiterada en los cortes del tallo de la *Salicornia eu.* expuestas fundamentalmente a intermedias concentraciones, aunque también se observa su presencia a altas concentraciones de disolución dopante. Los valores de área obtenidos sugieren su formación al inicio del ensayo, disminuyendo la cantidad formada de este metabolito con el transcurso de las semanas, obteniendo en la primera semana valores correspondientes a más de 1300 u.a y a los 21 días de ensayo 400 u.a, con lo que la formación de este metabolito podría estar relacionada con la cantidad de disolución dopante administrada y con el tiempo transcurrido.

El metabolito DCL-S 9 formado a partir de la molécula padre de diclofenaco con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$, aparece repetidamente a intermedias y altas concentraciones, encontrándose tanto en el tallo como en la raíz de la planta, predominando en casi todas las muestras a los 21 días de ensayo de exposición. Cabe señalar en este caso, que los mayores valores de áreas corresponden a los primeros cortes realizados tras 7 y 14 días de exposición, lo cual indicaría que su presencia puede estar realacionada con el buen estado general de la planta, dejando de producirse a medida que en esta se aprecian claros signos de deterioro.

En todas las muestras del primer corte del tallo de *Salicornia eu.* predomina el metabolito DCL-S 14 procedente de una hidroxilación con pérdida del fragmento $-C_6H_3NCl_2$ a un tiempo de retención de 5.71 minutos. Este metabolito está claramente relacionado con la concentración de disolución dopante de riego ya que se observa como va aumentando el área de este, al disminuir la concentración de disolución a la cual han sido expuestas las plantas.

En general, se observa un mayor número de metabolitos en las plantas expuestas a intermedias concentraciones, disminuyendo considerablemente en las sometidas a bajas concentraciones de disolución dopante, no encontrándose a penas metabolitos en las muestras de alta concentración ni en la raíz de la *Salicornia eu.*, estos resultados concuerdan en gran medida con los obtenidos para ibuprofeno. Esto podría indicar, que cuando la *Salicornia eu.* se expone a una elevada concentración de una mezcla de principios activos, sufre un gran deterioro por lo que su actividad metabólica cesa casi desde el inicio, sin embargo, bajo una exposición moderada, la planta inicialmente se activa, probablemente para contrarrestar el efecto, para terminar sufriendo dicho deterioro y de ahí la ausencia de metabolitos relacionados con diclofenaco en la raíz. Por el contrario, a bajas concentraciones de exposición, se observa un comportamiento muy desigual en las dos plantas sometidas al ensayo, ya que si bien en la planta P5, no se observa efecto hasta el tercer corte, lo cual podría estar relacionado con una baja absorción del principio activo, en la planta P6, parece haber una respuesta en el primer corte muy acusada, lo que se deduce de los valores de área obtenidos, para cesar bruscamente, lo que indicaría o bien, un deterioro notable de esta, o bien una adaptación a su presencia, lo cual parece más que probable, dada la presencia de varios posibles compuestos relacionados con diclofenaco en la raíz.

Tabla 33. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con diclofenaco.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1	DCL-S 26	327			DCL-S 16	112/123		
						DCL-S 18	205		
	P1					DCL-S 28	144		
						DCL-S 28	170		
	P1					DCL-S 9	285		
						DCL-S 28	180		
	P2	DCL-S 14	1451	DCL-S 3	1009	DCL-S 9	537	DCL-S 9	117
		DCL-S 27	172	DCL-S 25	764	DCL-S 16	214		
		DCL-S 28	79	DCL-S 27	943				
	P2	DCL-S 27	274	DCL-S 25	814	DCL-S 16	235		
			DCL-S 26	507	DCL-S 37	104			
			DCL-S 27	916					
700 µg/L	P3	DCL-S 9	1910	DCL-S 3	1650	DCL-S 9	306	DCL-S 6	969
		DCL-S 33	96	DCL-S 9	541	DCL-S 6	4383	DCL-S 31	392
						DCL-S 11	1981		
	P3					DCL-S 9	419	DCL-S 6	1124
						DCL-S 23	118	DCL-S 35	772
						DCL-S 6	5278		
	P3					DCL-S 11	1924		
						DCL-S 6	3232	DCL-S 6	1066
						DCL-S-3 11	1555	DCL-S 24	1290
	P4	DCL-S 12	123	DCL-S 4	11796/10171	DCL-S 3	321/401	DCL-S 32	248
		DCL-S 19	397	DCL-S 7	3565/4410	DCL-S 5	60		
		DCL-S 21	377	DCL-S 9	1013/624	DCL-S 30	340/154		
		DCL-S 14	2133	DCL-S 15	384	DCL-S 26	2174		
	P4	DCL-S 3	1369	DCL-S 3	1360/2040	DCL-S 4	604	DCL-S 32	291
		DCL-S 19	362	DCL-S 4	11796/11647	DCL-S 15	876		
		DCL-S 21	285	DCL-S 6	6002/6484	DCL-S 30	609/606		
		DCL-S 14	2094	DCL-S 7	3565	DCL-S 6	4039		
	P4					DCL-S 11	1675		
		DCL-S 8	110	DCL-S 3	1697/1373	DCL-S 5	84	DCL-S 32	360
		DCL-S 9	2516/2547	DCL-S 21	262	DCL-S 9	343		
		DCL-S 15	349/372	DCL-S 33	102	DCL-S 18	194		
		DCL-S 19	1123	DCL-S-3 11	3457	DCL-S 6	4679		
DCL-S 14		2339			DCL-S 11	1223			
10 µg/L	P5	DCL-S 22	242			DCL-S 32	1310		
		DCL-S 36	802	DCL-S-3 11	4781	DCL-S 1	5468/6228	DCL-S 32	844
						DCL-S 25	3060/4134		
						DCL-S 6	6861		
						DCL-S 20	1924		
						DCL-S 26	5547		
	P5					DCL-S 17	1106		
		DCL-S 6	9596			DCL-S 1	11335		
						DCL-S 2	5174		
						DCL-S 25	5342		
	P5					DCL-S 6	6862		
						DCL-S 17	1106		
						DCL-S 1	6118		
						DCL-S 2	4167		
	P6					DCL-S 11	2949		
						DCL-S 6	7798		
	P6			DCL-S 29	2906			DCL-S 34	108
		DCL-S 12	3190					DCL-S 10	1011
		DCL-S 14	4018					DCL-S 12	294
		DCL-S 11	2336						
		DCL-S 35	4996						
	P6	DCL-S 14	4578					DCL-S 16	254

4.18. IBUPROFENO EN *SALICORNIA EUROPAEA*

En la tabla 34, se presentan los resultados obtenidos en la raíz y tallo de *Salicornia eu.* En general, el número de metabolitos identificados en este caso es bastante menor que en el resto de principios activos analizados hasta ahora, siendo inexistente a bajas concentraciones de exposición. Se aprecia en la segunda y tercera semana del ensayo de exposición, correspondiente a 14 y 21 días de ensayo, el mayor número de metabolitos para todas las muestras que resultaron positivas. Sin embargo, el número de metabolitos es menor a tiempos menores de exposición, en el que solo se identificaron metabolitos en las muestras regadas con una disolución de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en cada uno de los fármacos.

Se observa un crecimiento gradual en la cantidad de metabolitos desde el comienzo del ensayo, llegando a un equilibrio entre el estado de la planta, la absorción de analitos y el tiempo de administración, hasta adquirir metabolitos en plantas sometidas a altas concentraciones de principios activos de las plantas P1 y P2 sometidas a altas concentraciones de principios activos. Los metabolitos identificados, proceden de una ruta metabólica que implica una hidratación (IBU-S 5; IBU-S 6; IBU-S 7; IBU-S 8).

Las muestras que fueron regadas con la disolución de analitos a una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no fueron capaces de generar ningún metabolito ni en la raíz ni en los tallos, probablemente debido a la baja concentración de disolución a la cual fueron expuestas.

En la raíz de la planta, predominan las rutas metabólicas de demetilación obteniéndose en las plantas sometidas a intermedias y altas concentraciones de disoluciones dopantes. Destacar que estos mismos metabolitos aparecen también en algunas de las muestras del tercer corte, lo que podría indicar que son metabolitos de difícil absorción por la planta, lo que justificaría su presencia tan solo en aquellas plantas que presentan mayores valores de área en la raíz.

Tabla 34. Posibles metabolitos encontrados en plantas de *Salicornia eu.* sometidas a los ensayos de exposición con ibuprofeno.

		Corte 1		Corte 2		Corte 3		Raíz	
		Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área	Metab.	Área
10 mg/L	P1					IBU-S 1	4490		
	P1					IBU-S 1	4716		
	P1					IBU-S 5	1417		
	P1					IBU-S 1	3302		
	P1					IBU-S 5	1014		
	P1					IBU-S 6	701		
	P2			IBU-S 5	1588	IBU-S 1	3688	IBU-S 1	2949
	P2			IBU-S 6	1122	IBU-S 2	4819	IBU-S 2	3692
	P2			IBU-S 7	823	IBU-S 5	1508	IBU-S 3	1131
	P2					IBU-S 6	968		
	P2			IBU-S 5	1782	IBU-S 2	3822	IBU-S 1	2537
	P2			IBU-S 6	1050	IBU-S 1	2729	IBU-S 2	3709
	P2			IBU-S 7	898			IBU-S 3	559
	P2					IBU-S 2	4121		
	P3	IBU-S 5	5264	IBU-S 5	5302	IBU-S 6	919	IBU-S 1	279
	P3	IBU-S 6	2719	IBU-S 6	1098	IBU-S 7	670		
700 µg/L	P3			IBU-S 7	520	IBU-S 5	1312	IBU-S 1	263
	P3					IBU-S 6	755	IBU-S 2	226
	P3					IBU-S 7	493	IBU-S 5	94
	P3					IBU-S 5	938		
	P3					IBU-S 6	496		
	P4	IBU-S 5	4143	IBU-S 5	2976	IBU-S 5	2007	IBU-S 1	520
	P4	IBU-S 6	2789	IBU-S 6	1655			IBU-S 2	683
	P4			IBU-S 7	839			IBU-S 3	685
	P4	IBU-S 5	4400	IBU-S 5	2694	IBU-S 5	2245		
	P4	IBU-S 6	3112	IBU-S 6	1304	IBU-S 1	749		
	P4	IBU-S 8	3367	IBU-S 6	1945				
	P4			IBU-S 7	829				
10 µg/L	P5								
	P5								
	P5								
	P6								
	P6								
	P6								

5. RESULTADOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

La colección de 150 plantas extraídas con cuatro disolventes distintos; etanol, hexano, acetato de etilo y agua: etanol (50:50, v/v), hacen un total de 600 muestras testadas con las enzimas tirosinasa, collagenasa, elastasa y lipoxigenasa. Como criterio de selección, de todos los resultados obtenidos, solo se eligieron como válidas las que presentaron una inhibición enzimática superior al 50%, para que los extractos de las plantas sean de interés comercial, ya que tienen que presentar al menos un valor de IC_{50} , es decir, han de tener como mínimo un 50% de inhibición en los distintos procesos enzimáticos [144].

Una vez analizada la actividad enzimática y seleccionadas aquellas muestras con actividad superior al 50%, se realizó revisión bibliográfica para descartar aquellas plantas de las que existieran estudios previos con las enzimas empleadas en esta tesis. De las 150 plantas testadas, únicamente cinco muestras prosiguieron en el estudio, al no haberse encontrado documentación bibliográfica referente a la inhibición de estas plantas con sus respectivas enzimas. El objetivo era determinar, determinar, identificar y aislar la parte o fracción de la muestra que presenta inhibición a la enzima, con el fin último de incorporarla en el desarrollo de nuevos activos cosméticos naturales. Los extractos naturales o las fracciones de ellos que muestran una elevada bioactividad generalmente no se pueden incorporar de forma directa en una formulación, ya que pueden mostrar cualidades indeseables, como olor, color, viscosidad, etc. Por ello, es necesaria la adición de un soporte cosmético apropiado (líquido o sólido) para facilitar la incorporación de activos naturales en una formulación cosmética [214].

En esta tesis nos hemos centraremos fundamentalmente en determinar las fracciones de las muestras de extractos de las plantas seleccionadas que inhiben dichas actividades enzimáticas. La identificación y aislamiento de estas moléculas se realizará en estudios posteriores.

En el caso de la **enzima tirosinasa**, cuyos inhibidores son utilizados por sus aplicaciones como agentes blanqueadores de la piel, antienvjecimiento, antiarrugas y en el tratamiento de trastornos dermatológicos [144], de toda la colección de plantas analizadas, las únicas muestras que presenton una elevada oposición a la reacción enzimática son la nº 129 extraída en una mezcla H_2O : EtOH (1:1, v/v) (*Pistacia lentiscus*) con el sustrato L-Tirosina, que alcanzó un porcentaje de inhibición cerca del 60% y la muestra nº 78 extraída en etanol correspondiente a la planta *Lycianthes rantonnetii* con el sustrato L-DOPA.

La planta *Pistacia lentiscus* es muy utilizada como inhibidor de las enzimas tirosinasa y elastasa, según los estudios realizados por I.Chicocchi et al. [215] en concreto es un potente

inhibidor de la enzima tirosinasa como demuestran los trabajos de López et al. [216], por lo que queda descartada para los siguientes análisis.

Sin embargo la planta *Lycianthes rantonnetii* (n° 78) presentó un porcentaje de inhibición del 57% para la enzima tirosinasa con el sustrato L-DOPA, y dado que no se encontraron referencias bibliográficas de esta planta como inhibidor de dicha enzima, fue seleccionada para su fraccionamiento en la siguiente etapa.

De los resultados obtenidos con **enzima lipoxigenasa**, solamente los extractos, 46 con acetato de etilo y etanol, mostraron una inhibición superior al 50% a la enzima, en el caso de la planta n° 46, *Hemerocalli*. se observa una inhibición enzimática del 71% en el extracto de etanol y del 51% en acetato de etilo.

El resto de las muestras que dieron positivo, corresponden a plantas que contienen una molécula que es inhibidora de la enzima y está documentada en la bibliografía consultada, es por eso que no son considerados como nuevos inhibidores, por ejemplo, la muestra N° 49 correspondiente a la planta *Prunus cerasifera* con una inhibición cerca del 100% en nuestros resultados, concuerda con los estudios realizados por Florence T. et al. [217], al igual que las cabezas de flores de *Euryops pectinatus* en los ensayos llevados a cabo por Nesseem D.I. et al. [218] presentan una alta actividad antiinflamatoria, relacionada con dicha enzima, esta planta pertenece a la familia *Asteraceae*, misma familia que la planta n° 3 de nuestra colección *Anacyclus radiatus*, con una inhibición del 75% extraída en etanol, descartada para los ensayos posteriores por estar documentada la actividad antiinflamatoria la familia a la que pertenece [219, 220].

Así como el *Eucalyptus* (n° 1) del que se aisló un flavonoide inhibidor de la lipoxigenasa en los estudios realizados por Shwu-Woan [221] o la planta n° 78, seleccionada con la enzima tirosinasa, pero descartada con la lipoxigenasa, aunque los extractos en etanol y acetato de etilo presentan una inhibición superior al 65% y aún no existir referencias bibliográficas sobre su papel en la inhibición de esta enzima, la familia a la que pertenece *Solanaceae*, está ampliamente documentada en su actividad antiinflamatoria, como queda reflejado en los estudios de Nacoulma et al. [222], Helvace S. et al. [223] o Khan et al. [224].

La planta n° 78 muestra un porcentaje de inhibición con la enzima lipoxigenasa del 50%, aunque no existen estudios que abalen la inhibición de *Lycianthes rantonnetii* con esta enzima, si se ha documentado la actividad antiinflamatoria que presentan varias plantas pertenecientes a la familia de las *Lycianthes rantonnetii*, la familia *Solanaceae*, como son los ensayos realizados in vitro de las actividades antioxidantes y anti-inflamatorias de los extractos de *Nicotiana tabacum* L. perteneciente a la misma familia realizados por Nacoulma et al. [222], por lo que se eliminó en el estudio de la enzima lipoxigenasa.

Los extractos 57 etanol y 57 acetato de etilo con una inhibición superior al 80 y al 50% respectivamente, proveniente de la planta *Viburnum tinus*, perteneciente a la familia de las *Adoxaceae*, poseen una conocida actividad antiinflamatoria debido al gran contenido en antocianinas y otros polifenoles como se menciona en el trabajo de Crisan M. et al. [225] o de Olenic L et al [226], lo que excluyó estos extractos de ensayos posteriores.

Con la **enzima elastasa**, todas las muestras con una elevada inhibición son plantas ya conocidas o estudiadas con esta enzima, por ejemplo la planta n° 1, *Eucalyptus* con una inhibición a la enzima superior al 80% con todos los disolventes salvo con hexano, está previamente documentada en el trabajo Inomata et al. [227].

Los extractos n° 23, *Nerium oleander* en etanol y acetato de etilo, inhiben más de un 50% la actividad de la enzima elastasa, mientras que en los disolventes hexano y agua:etanol (1:1, v/v) su porcentaje de inhibición no llega al 10%, esto es debido, como se ha mencionado anteriormente al efecto que ejerce el disolvente sobre la extracción de las moléculas presentes en las plantas, resultando en mayor o menor rendimiento según las características de los compuestos. Esta planta perteneciente a la familia de las *Apocynaceae*, así como la planta n° 124 *Petite salmon oleander*, conforme los estudios realizados por A. Rajic et al. [228] en la corteza de las raíces de las plantas pertenecientes a esta familia se han encontrado compuestos que inhiben la enzima elastasa, de ahí que fueran descartados estos extractos en nuestro estudio. Por lo que no hay ningún extracto que presente un elevado IC₅₀ y que no esté documentado en la bibliografía, salvo por el extracto n° 46 en acetato de etilo (*Hemerocallis*) con una inhibición del 51%.

En la **enzima colagenasa**, casi todas las muestras presentaron una inhibición inferior al 50%, igual que con la enzima tirosinasa y el sustrato L-Tirosina, salvo algunos extractos de plantas que ya son conocidas por su relación con esta enzima, como el extracto n° 52 en acetato de etilo con una inhibición superior al 90% con la enzima colagenasa y cerca del 50% en sus estudios con la enzima lipoxigenasa, pero suprimida en los análisis siguientes por estar demostrada su actividad con ambas enzimas e incluso con la enzima hialuronidasa en las investigaciones realizadas por Persson et al. [229]. Por tanto, ningún extracto ha sido seleccionado para el estudio de la inhibición de la enzima colagenasa.

Lo mismo sucede con los extractos de la planta n° 27 que corresponde a *Arbutus undedo* con unos porcentajes de inhibición superiores al 75% en todos los disolventes salvo en hexano, pero cuya actividad inhibitoria de la enzima elastasa ha sido descrita con anterioridad en las investigaciones de Seibu Y. et al. por pertenecer a la familia de las *Ericaceae* [230].

Con todo lo expuesto, se seleccionaron para identificar las fracciones activas que muestran inhibición con las enzimas, la muestra 78 en etanol para la enzima tirosinasa con el sustrato L-

DOPA, para la enzima lipoxigenasa las muestras 46 en etanol, 46 en acetato de etilo y con la enzima elastasa 46 en acetato de etilo, que aparecen resaltadas en amarillo en la tabla del anexo III.

Se realizó una disolución de dichas plantas (figuras 49 y 50) en sus correspondientes disolventes a una concentración $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y posterior extracción durante 15 minutos en el baño ultrasonidos, dos horas de maceración con agitación, filtración y evaporación del disolvente, reconstituyendo las muestras en metanol a una concentración final de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Figura 49. Planta nº 46
Hemerocallis.



Figura 50. Planta nº 78
Lycianthes rantonnetii.

5.1. ANÁLISIS DE FRACCIONES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN HPLC

Los nuevos extractos obtenidos de las plantas *Hemerocallis* y *Lycianthes rantonnetii* se analizaron utilizando un sistema HPLC Agilent 1200, con detector de matriz de diodos DAD y un ELSD (detector de dispersión de luz evaporativa) que opera bajo las condiciones que se recogen en la tabla 35, condiciones desarrolladas y optimizadas para empleadas en ensayos similares por el grupo de investigación, Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale del Instituto de Química de Niza.

Con el fin de identificar la parte bioactiva responsable de la actividad enzimática, e intentar aislar la molécula responsable, una vez inyectada la muestra, el eluyente se recogió en fracciones cada 2 minutos a la salida de la columna, tras la separación cromatográfica (ver anexo IV). A continuación se evaporó hasta sequedad y se disolvió cada extracto con distintos volúmenes de DMSO, para obtener una concentración final de $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estas nuevas fracciones fueron testadas con sus correspondientes enzimas, para poder saber que fracción de la planta presentaba inhibición y así aislarla, sin embargo, sorprendentemente ninguna fracción de las muestras nº 78 y 46 con sus respectivos disolventes mostraron un elevado IC_{50} , lo que implica, que no existe una fracción claramente responsable de la inhibición enzimática.

Por ello, se realizó un análisis mediante UHPLC-Q-TOF-MS, en las condiciones descritas en la tabla 36, con el objeto de establecer una relación entre los inhibidores estándar empleados en los tests enzimáticos y las muestras seleccionadas con inhibición a las enzimas, modificando el gradiente de separación y cambiando la columna cromatográfica.

Tabla 35. Separación y condiciones cromatográficas empleadas en el análisis en HPLC de las fracciones.

Columna	C18 Phenomenex, Luna ® (150 mm x 4.6 mm id, 5 µm)			
DAD	254, 220, 280 nm			
ELSD	Presión de gas nebulizador : 3.5 bares Tª del tubo de evaporación : 40°C Ganancia : 3			
Eluyentes	A: Ácido fórmico 0.1% en agua B: Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo C: 2-propanol			
Flujo	1 mL/min			
Volumen de inyección	20 µL			
Gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
	0	95	5	0
	5	95	5	0
	40	55	45	0
	50	0	100	0
	52	0	100	0
	58	0	20	80
	60	0	20	80
	65	0	0	100
	70	0	0	100
	75	95	5	0

Por ello, se realizó un análisis mediante UHPLC-Q-TOF-MS, en las condiciones descritas en la tabla 36, con el objeto de establecer una relación entre los inhibidores estándar empleados en los tests enzimáticos y las muestras seleccionadas con inhibición a las enzimas, modificando el gradiente de separación y cambiando la columna cromatográfica.

Tabla 36. Separación y condiciones cromatográficas empleadas en el análisis UHPLC-Q-TOF-MS.

Columna	ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 mm x 4.6 mm id, 1.7 µm)			
Eluyentes	A: Ácido fórmico 0.1% en agua			
	B: Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo			
	C: 2-propanol			
Flujo	0.5 mL/min			
Volumen de inyección	5 µL			
Gradiente:	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
	0	95	5	0
	5	95	5	0
	40	55	45	0
	50	0	100	0
	52	0	100	0
	58	0	20	80
	60	0	20	80
	65	0	20	80
	70	0	60	40
	75	95	5	0

Una vez obtenidos los cromatogramas de los extractos de las plantas 46 EtOH, 46 AcEt y 78 EtOH, así como de los inhibidores estándar empleados en los test enzimáticos, se procesaron las muestras con ayuda del software MetaboLynx, para tratar de encontrar una relación entre las plantas con resultados positivos a la actividad enzimática de las enzimas lipoxigenasa y tirosinasa y los inhibidores estándar conocidos de ambas, es decir, tratar de identificar en que parte del cromatograma de las plantas seleccionadas se encuentra la molécula o moléculas responsables de

la inhibición. Para ello, se intenta identificar en dichos extractos, bien los inhibidores estándar de referencia, o bien, metabolitos de dichos inhibidores estándar o moléculas de estructura más compleja, cuyo espectro de fragmentación produzca iones coincidentes con los inhibidores estándar de referencia empleados en los test enzimáticos.

Los extractos obtenidos en los disolventes acetato de etilo y etanol son los que presentan una mayor inhibición enzimática, esto podría explicarse según el trabajo de Burger et al. por el hecho de que los disolventes polares y concretamente el etanol, son apropiados para la extracción de polifenoles y flavonoides de las matrices vegetales [144].

En la planta *Hemerocallis*, extraída con etanol, una vez procesados y analizados los resultados (tabla 37 y figura 51), se encuentra la presencia de un metabolito procedente de una hidroxilación de quercetina, a tiempo de retención 6.58 min (figuras 53 y 54).

Con tiempos de retención de 4.78 y 14.06 minutos (figura 52), se obtuvieron picos cromatográficos relacionados de algún modo con la molécula de quercetina. El análisis detallado de estos picos cromatográficos y sus correspondientes espectros de masas (figuras 54 y 55), mostró espectros conteniendo picos a relaciones m/z coincidentes con quercetina y sus correspondientes fragmentos (303.050, 273.040 y 257.045), aunque el pico base de dicho espectro muestra una relación m/z 465.105 para la señal obtenida a 14.06 minutos y 423.094 en el caso de 4.78 minutos (figura 55).

Se deduce de dicho análisis, que se puede tratar de moléculas más complejas que comparten estructura con la molécula de quercetina, ya que poseen un espectro de fragmentación coincidente con esta. Esto puede explicar que la planta muestre oposición a la actividad enzimática de lipoxigenasa y tirosinasa, ya que parece haber una similitud estructural, y su presencia es muy abundante en las muestras analizadas, lo que se deduce de los elevados valores de área de pico obtenidos.

Esta podría ser la razón, por tanto, de que el extracto nº46 EtOH presenta oposición a la actividad de la reacción enzimática de la enzima lipoxigenasa inhibiendo un 71.63% (ver tabla del anexo III).

El análisis del extrato con acetato de etilo (figuras 56 y 57), muestra la presencia de picos cromatográficos a tiempos de retención coincidentes con el extracto en etanol, cuyos espectros presentan una total coincidencia, lo que supone que la molécula (ó moléculas) responsable de la inhibición enzimática, se extrajo en ambos disolventes orgánicos. Los cromatogramas y espectros correspondientes se muestran en la tabla 38 y en las figuras 58 y 59. La muestra 46 extraída con

acetato de etilo muestra una inhibición con la enzima lipoxigenasa del 51.48%, mientras que presenta un porcentaje de inhibición del 51.19% frente a la actividad de la enzima elastasa.

El análisis de la planta *Lycianthes rantonnetii* extraída con etanol, (extracto n° 78 EtOH), que presentaba inhibición para la enzima lipoxigenasa, se dirigió inicialmente hacia la búsqueda de resveratrol (inhibidor utilizado para la enzima lipoxigenasa) o moléculas relacionadas con este, no obteniéndose resultados positivos en este sentido. Sin embargo, tal y como se describe en bibliografía y como se ha mencionado previamente en la introducción, los flavonoides también actúan como inhibidores competitivos de la enzima lipoxigenasa, por lo que se procedió a procesar el cromatograma obtenido del extracto (figura 60) empleando quercetina como inhibidor de referencia.

La quercetina unida a la enzima tirosinasa impulsada por la interacción hidrofóbica, produce un cambio conformacional de la enzima, al quelatar un cobre con los grupo 3' y 4' -dihidroxi, de forma que la quelatación impide la entrada del sustrato y por tanto inhibir la actividad catalítica de la enzima tirosinasa [231], actuando de forma competitiva para el sitio de unión L-dopa de la enzima [232], esto mismo demuestran los trabajos de de Kubo et al., en los que demuestran la actividad inhibitoria de la tirosinasa con los flavonoles (clase de flavonoide) [233].

Además los estudios de Sohretoglu et al. sugieren que los flavonoides, especialmente los que contienen 3', 4'-dihidroxisustitución en el anillo B (ver sección Parte Experimental) tienen un elevado potencial para el desarrollo de un inhibidor de la enzima tirosinasa, puesto que la presencia de un grupo hidroxilo adicional en la posición C-3' aumenta el efecto inhibidor de la tirosinasa [234].

En la figura 61, se muestra el cromatograma de iones extraídos a relación m/z 303.0501 correspondientes al ión $[M+H]^+$ de quercetina. El espectro del pico cromatográfico obtenido a 11.78 minutos (figura 62), contiene un fragmento cuya masa coincide con quercetina, aunque se observa que el pico base del espectro está a 465.1034 m/z, lo cual sugiere una molécula de estructura más compleja con similitud estructural a quercetina, cuya fragmentación genera un espectro coincidente entre otros la masa de esta a 303.0501 m/z.

Como se aprecia en la figura 61, el pico cromatográfico obtenido a 12.41 minutos, presenta una coincidencia completa en tiempo de retención y espectro de masas con el control de quercetina estándar de referencia analizada, ya que dicha señal, se encuentra también en el cromatograma del control de quercetina, con un espectro que presenta un pico base a 611.1618 m/z (figura 63), además de todos los fragmentos coincidentes con el espectro de quercetina (303.050, 273.040 y 257.045). Esto podría explicar por tanto, que la muestra 78 EtOH presente un porcentaje de inhibición del 57% con la enzima tirosinasa y el sustrato L-DOPA.

En futuros trabajos investigación se intentará aislare identificar mediante RMN la parte de los extractos de las plantas que contienen metabolitos de la quercetina, para poder identificar exactamente la molécula responsable de la inhibición enzimática.

Análisis de la planta *Hemerocallis* extraída con EtOH.: muestra 46 EtOH.

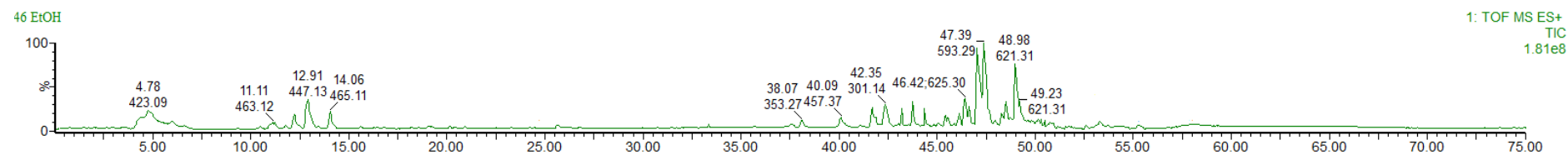


Figura 51. Cromatograma de iones totales obtenido a partir de la planta *Hemerocallis* extraída con EtOH.

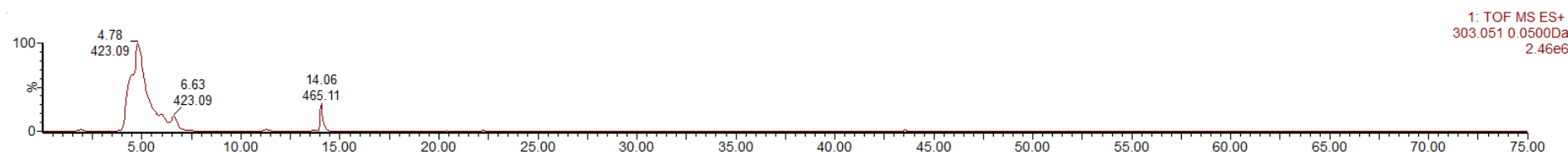


Figura 52. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 46 EtOH.

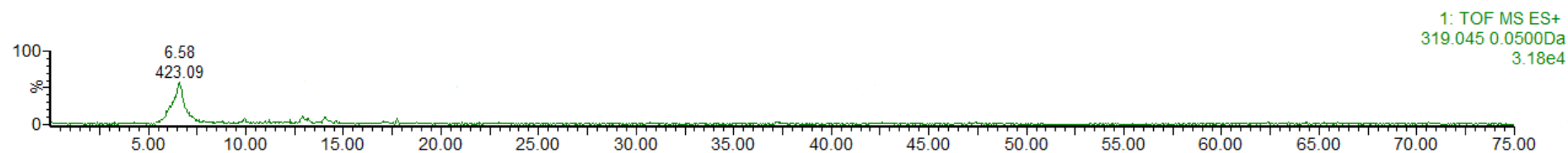
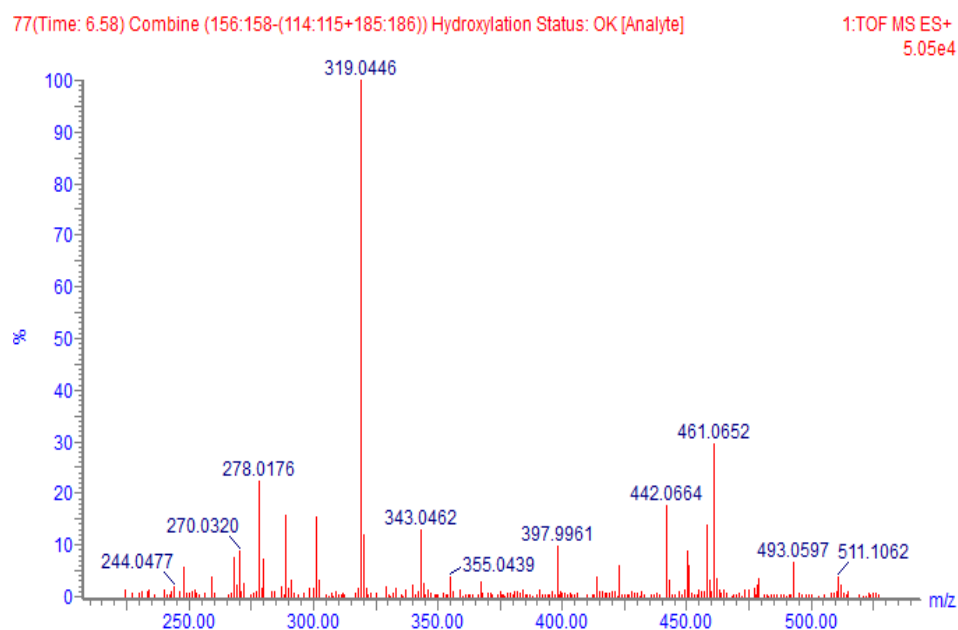
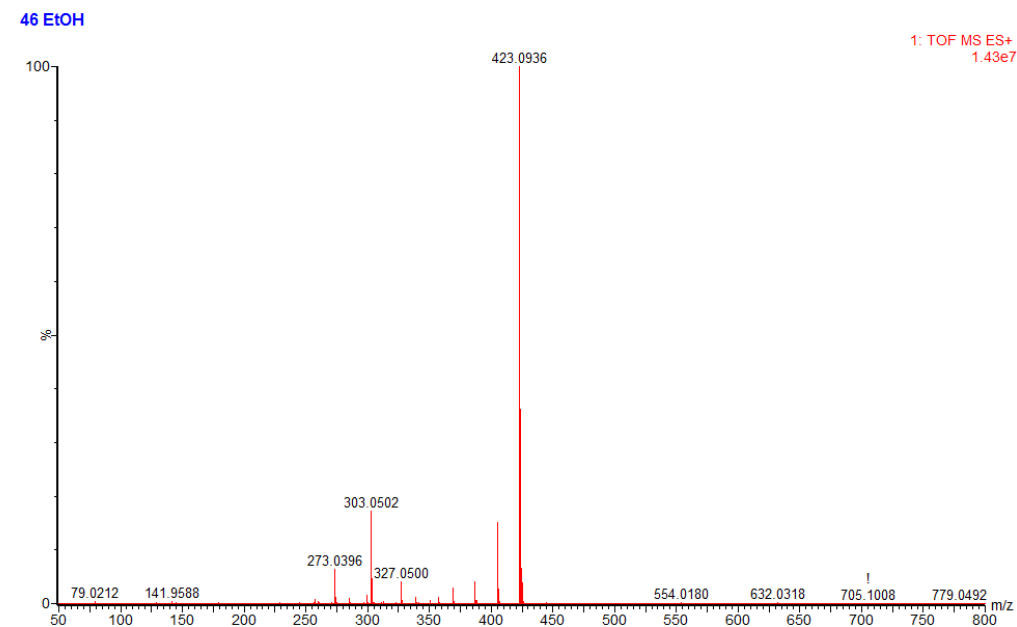


Figura 53. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z del posible metabolito obtenido a partir de hidroxilación en extracto 46 EtOH.

Tabla 37. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 46 EtOH.

Masa teórica	m/z encontrada	tr minutos	Error (ppm)	Fórmula	Ruta	Área
318.0376	319.0446	6.58	-2.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	Hydroxylation	13077
302.0427	303.0503	4.82	-0.5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	1715439
302.0427	303.0505	14.06	0.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	152094

**Figura 54.** Espectro obtenido del posible metabolito de hidroxilación de la muestra 46 EtOH con un tiempo de retención de 6.58 minutos.**Figura 55.** Espectro obtenido de la muestra 46 EtOH a tiempo de retención de 4.78 minutos.

Análisis de la planta *Hemerocallis* extraída con AcEt.: muestra 46 AcEt.

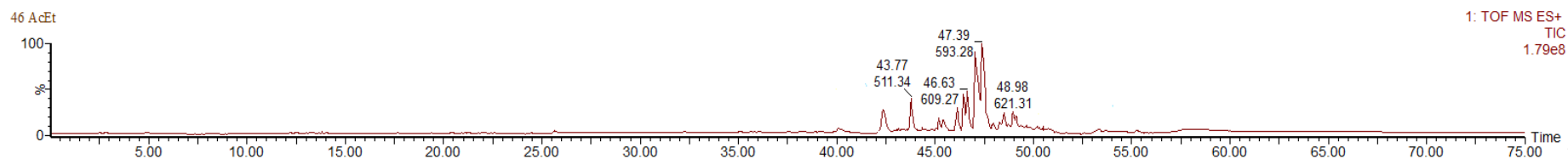


Figura 56. Cromatograma de iones totales obtenido a partir de la planta *Hemerocallis* extraída con AcEt.

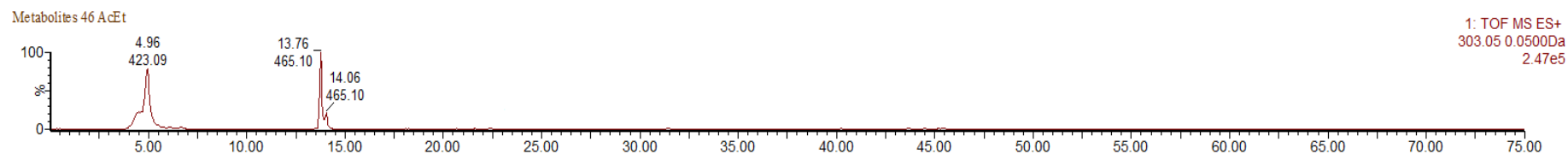
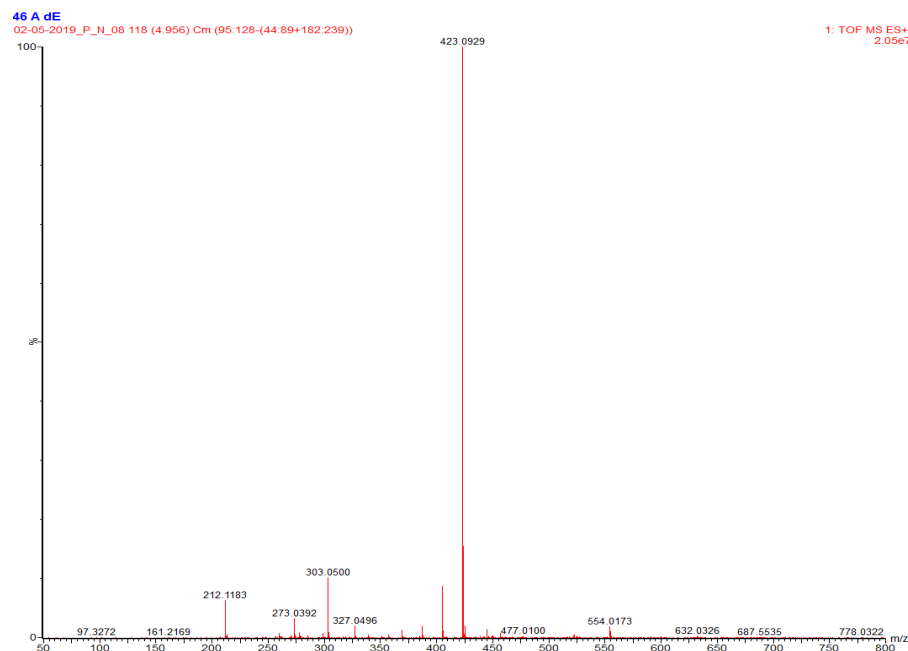
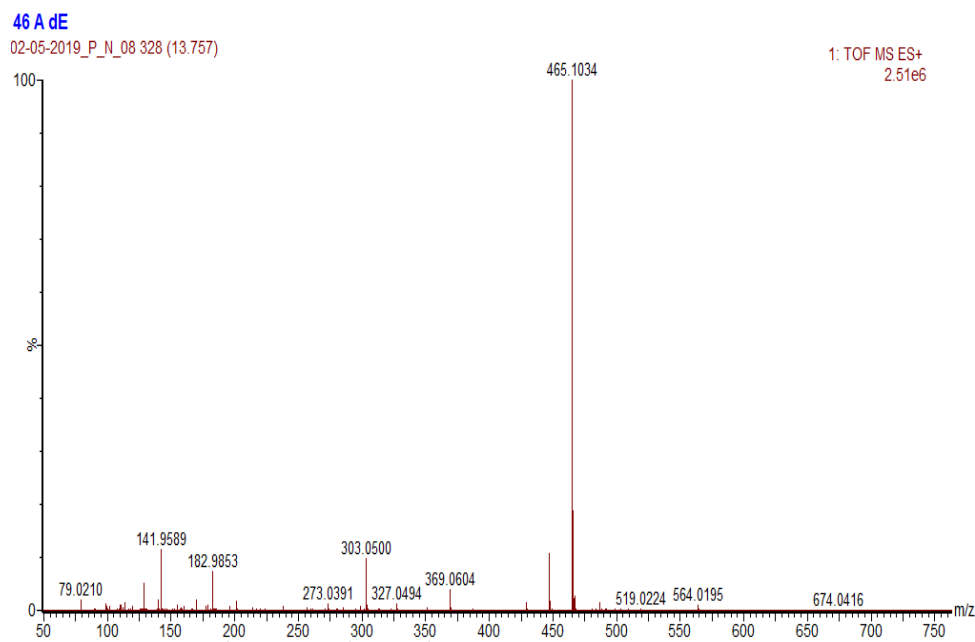


Figura 57. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 46 AcEt.

Tabla 38. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 46 AcEt.

Masa teórica	m/z encontrada	tr minutos	Error (ppm)	Fórmula	Ruta	Área
302.0427	303.0501	4.96	-1.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	69762
302.0427	303.0501	13.76	-1.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	37003

**Figura 58.** Espectro obtenido de la muestra de 46 AcEt a tiempo de retención de 4.96 minutos.**Figura 59.** Espectro obtenido a tiempo de retención 13.76 minutos.

Análisis de la planta. *Lycianthes rantonnetii* extraída con EtOH: muestra 78 EtOH.

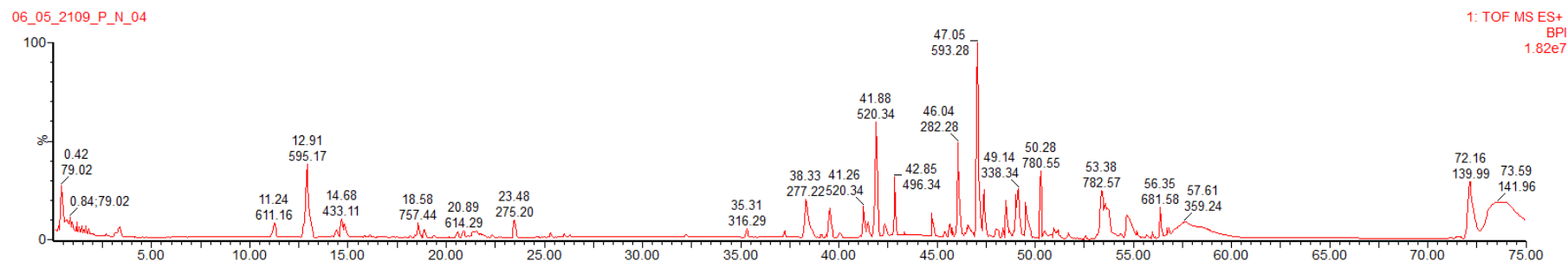


Figura 60. Cromatograma iones totales obtenido a partir de la planta *Lycianthes rantonnetii* extraída con EtOH.

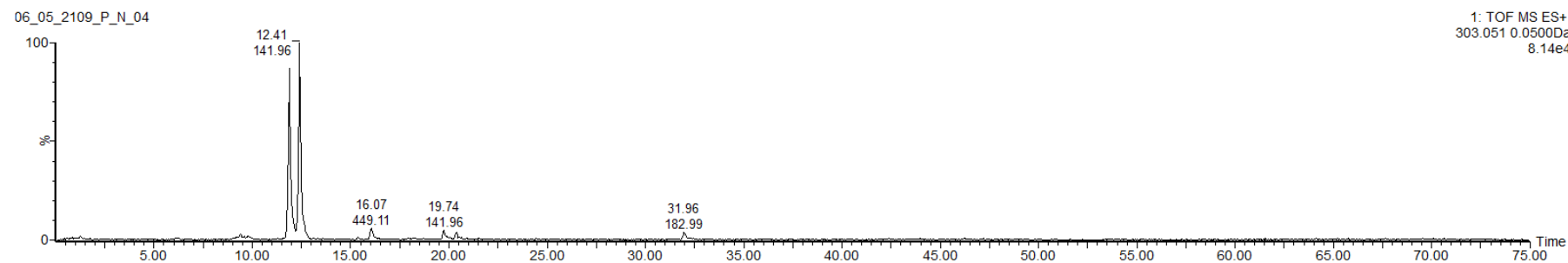
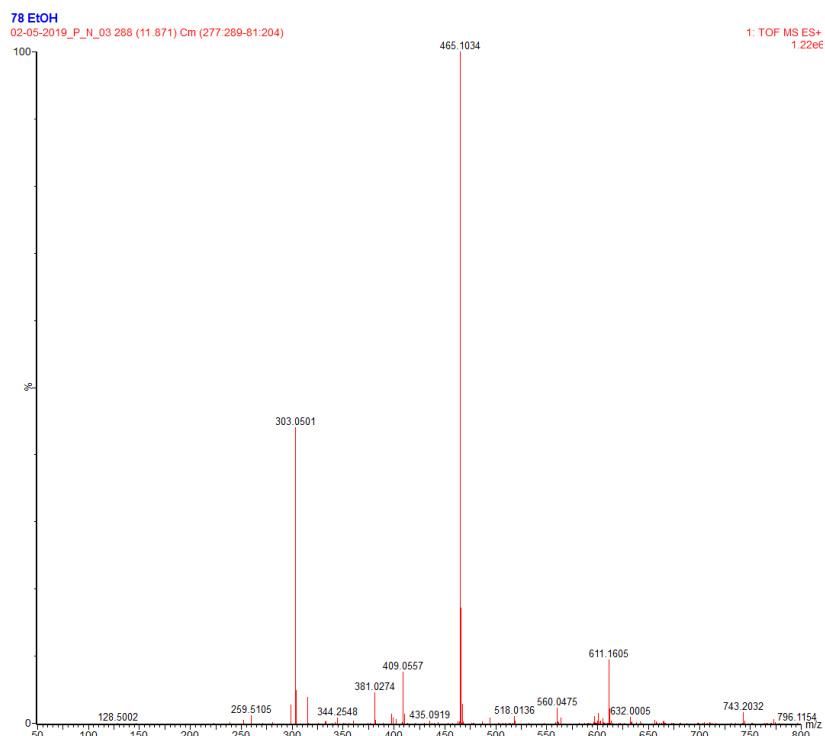
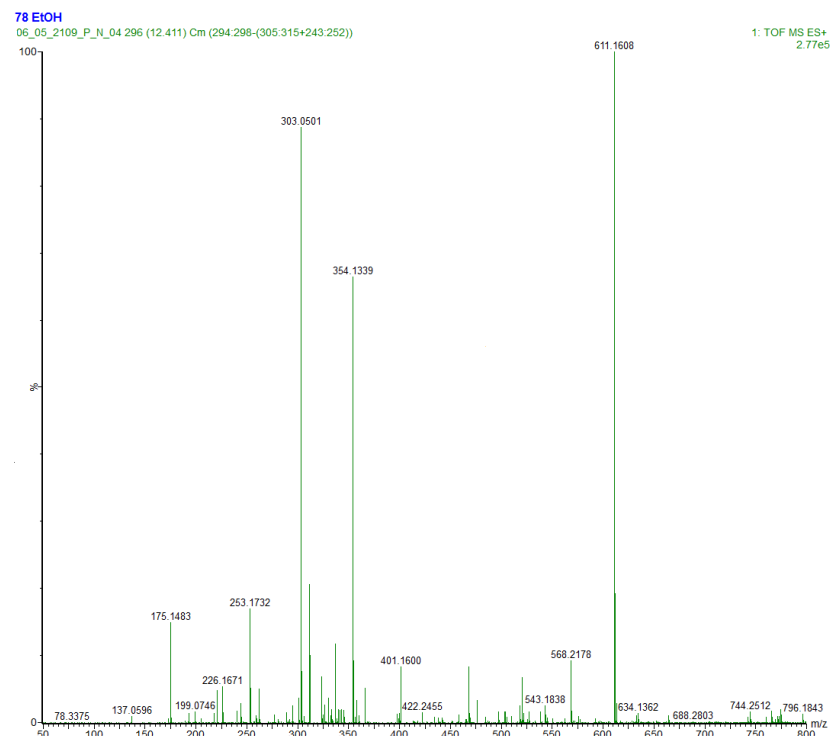


Figura 61. Cromatograma de iones extraídos a relación m/z de quercetina en la muestra 78 EtOH.

Tabla 39. Posibles metabolitos obtenidos a partir de la muestra 78 EtOH.

Masa teórica	m/z encontrada	tr minutos	Error (ppm)	Fórmula	Ruta	Área
303.0502	303.0502	11.87	-0.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	119312
302.0427	303.0502	12.41	-0.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	13733

**Figura 62.** Espectro obtenido a un tiempo de retención de 11.87 minutos.**Figura 63.** Espectro obtenido a tiempo de retención de 12.41 minutos.

5.2. ANÁLISIS DE ENSAYOS ANTIOXIDANTES

En el anexo III, se recogen los porcentajes de inhibición de las enzimas empleadas así como los resultados obtenidos de los ensayos de polifenoles, flavonoides y DPPH, de los extractos de las muestras empleadas en este trabajo.

Se observa como las muestras que presentan una elevada actividad antioxidante, muestran una fuerte inhibición con la enzima lipoxigenasa, como es el caso de la muestra nº 18 *Olea ambrensis* H. Perrier cuyos porcentajes de inhibición con la enzima lipoxigenasa con cercanos al 72% extraído con H₂O/EtOH, y superiores al 95% en los extractos con los disolventes EtOH, AcEt, mostrando unos elevados contenidos de polifenoles y flavonoides, así como las actividades antioxidantes en los ensayos de DPPH, siendo estas máximas en el extrato formado a partir de EtOH superando el 70% de la actividad antioxidante, mientras que no se observó actividad enzimática con el extracto formado a partir de hexano.

De igual manera sucede con los extractos de la muestra nº 21, correspondiente a la planta *Jaracanda minosifolia*, presenta una actividad antioxidante del 90% para el extracto obtenido en H₂O/EtOH y superior al 80% extraído con EtOH, una inhibición frente a la actividad de la enzima lipoxigenasa superiores al 73% y 95% respectivamente, además este último extracto presenta un elevado contenido de polifenoles. Un escenario similar ocurre en la muestra nº 22 *Myrtus communis* L., extraído con H₂O/EtOH y EtOH se observaron actividades antioxidantes mayores del 90% en los ensayos de DPPH así como una inhibición superior al 90% en los tests de la enzima lipoxigenasa con ambos disolventes

La muestra nº 46, seleccionada en este estudio, *Hemerocallis*, con un porcentaje de inhibición de la enzima lipoxigenasa del 71.36% extraída en etanol y del 51.48% para el extracto formado en acetato de etilo, presenta mayor actividad antioxidante así como un mayor contenido de polifenoles y flavonoides en el extrato de etanol que en el de acetato de etilo.

Como se ha documentado ampliamente en la bibliografía, así como en los trabajos de Burger et al. [144] parece existir una clara relación entre el contenido de polifenoles, flavonoides, con la elevada actividad antioxidante y la inhibición de la enzima lipoxigenasa, aunque esta relación no se cumple con el resto de las enzimas, probablemente por no ser polifenoles o flavonoides que pongan oposición a esas actividades enzimáticas.

Situación similar se muestra en las muestras nº 54, cuyos extractos de H₂O/EtOH y EtOH, presentan una actividad antioxidantes alrededor del 60% y una inhibición de la enzima

lipoxigenasa de casi el 80%, en la muestra nº 57 perteneciente a la planta *Viburnum Tinus*, se obtuvieron inhibiciones para la enzima lipoxigenasa superiores al 80% extraído con EtOH, y del 51.79% para el extracto de AcEt, así como una actividad antioxidante mayores del 80% y un elevado contenido de polifenoles y flavonoides, para todos los extractos salvo para el obtenido con hexano, el cual no mostró actividad antioxidante, ni contenido de polifenoles y flavonoides, por lo como se menciona en los estudios de Burger et al. la presencia de disolventes polares facilitan la extracción de polifenoles y flavonoides de las matrices vegetales [144].

Esta correlación entre el elevado contenido de polifenoles y flavonoides, la alta actividad antioxidante y fuerte inhibición a las enzimas sobre todo, la enzima lipoxigenasa sucede sobre todo en las planta que son conocidas por sus actividades antiinflamatorias y están previamente estudiadas por sus capacidades antioxidantes.

Los resultados de las muestras de *Juncus sp.* sometidas a los ensayos de exposición presentan con los distintos test antioxidantes (DPPH y polifenoles) y ensayos enzimáticos (lipoxigenasa, elastasa y tirosinasa), recogidas en el anexo III, un porcentaje de inhibición de la enzima lipoxigenasa superior al 40% para la muestra del planta P1, cortada en la primera semana, dopada a altas concentraciones de disolución dopante $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y extraída con acetato de etilo y una inhibición cercana al 22% para el segundo corte de la planta P1 extraída en etanol, mientras que la planta P2, expuesta también a altas concentraciones de disolución dopante de principios activos, presenta entre el primer y el tercer corte una inhibición entre el 10 y el 18% en los extractos de etanol.

Se observa una elevada actividad antioxidante en los ensayos de DPPH en las muestras P1, P2 y P3 extraídas con $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ frente a las extraídas con hexano cuyos resultados eran cercanos a cero. Además el tallo de *Juncus sp.* presenta una mayor capacidad de inhibición frente a las enzimas que la raíz, a pesar que en la raíz de la planta se obtuvieron mayores concentraciones de acumulación de los principios activos.

Por lo general como era de esperar las muestras sometidas a altas concentraciones de disoluciones dopantes de los principios activos presentan mayor contenido de polifenoles y flavonoides y un mayor porcentaje de inhibición enzimática, frente a las dopadas a bajas concentraciones, lo que pone de manifiesto la alteración interna que se produce en las plantas al estar expuestas a los principios activos farmacológicos.



CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, les résultats obtenus à partir des tests d'exposition des trois matrices de plantes sélectionnées dans le Parc National de Doñana seront analysés, en évaluant les accumulations de médicaments dans les différentes parties des plantes, ainsi que leur évolution pendant la durée de ces tests d'exposition. De plus, d'autres paramètres seront évalués, tels que la teneur en azote dans le substrat des plantes, afin de corrélérer l'état visuel de la plante avec les paramètres biochimiques.

De plus, les métabolites possibles trouvés dans les différentes plantes au cours des essais d'exposition seront présentés à l'aide du logiciel approprié (MetaboLynx) appliqué aux données chromatographiques de chaque échantillon.

D'autre part, les résultats obtenus à partir des différents tests enzymatiques dans la collection de 150 plantes autour de Doñana, dans les échantillons de *Juncus sp.* soumis au test d'exposition, ainsi que les résultats des tests antioxydants, seront exposés afin de déterminer la relation ou la similarité entre les contrôles positifs qui inhibent les différentes enzymes et les échantillons qui présentent une inhibition enzymatique et ne sont pas documentés dans la bibliographie.

1. L'HUMIDITÉ

Le pourcentage d'humidité des plantes utilisées dans les différents tests d'exposition a été évalué, puisque les extractions sont effectuées sur des plantes préalablement séchées, valeur nécessaire pour pouvoir exprimer les résultats sur l'échantillon original. Tige et feuille de *Lavandula dentata*, présente entre 40 et 50 % d'humidité, comme la tige des plantes *Juncus sp.* alors que les racines des deux plantes possèdent un pourcentage d'humidité entre 10 % et 15 %. Cependant, le pourcentage d'humidité de la racine de *Salicornia europaea* oscille entre 9 et 10 % et sa tige autour de 6 %.

2. TESTS D'EXPOSITION:

LES RÉSULTATS DE L'ACCUMULATION DES MÉDICAMENTS

Les résultats présentés ci-dessous sont organisés comme suit :

Dans le cas de *Lavandula dentata*, les tableaux montrent les résultats de deux plantes pour chacun des trois niveaux de concentration d'eau d'irrigation utilisés dans les échantillons de feuilles et de tiges (4 coupes, effectuées à 7, 14, 21 et 30 jours) et de racines (fin de l'essai, après 30 jours d'exposition), indiqués comme R1 (correspondant aux P1, P3 et P5) et R2 (correspondant aux P2, P4 et P6). Les échantillons ont été analysés en double. Les résultats de *Juncus sp.* sont également présentés pour la tige et la racine.

En *Salicornia eu.*, les résultats correspondent à l'analyse de six plantes à chacun des trois niveaux de concentration utilisés, dans des échantillons de tiges (3 coupes effectuées à 7, 14 et 21 jours) et de racines (fin de l'essai, après 21 jours d'exposition). Dans la plupart des cas, la petite quantité d'échantillon disponible ne permettait pas une analyse en double.

2.1. LAVANDULA DENTATA

Dans le cas de *Lavandula dentata*, seules des accumulations de fluméquine et de carbamazépine ont été détectées dans toutes les parties de la plante, car l'absorption des produits chimiques dépend largement de la nature hydrophobe ($\log P$), l'état d'ionisation des molécules, le pKa et le pH du sol.

La fluméquine et la carbamazépine ont été quantifiées dans tous les échantillons et à toutes les concentrations de l'échantillon, et on a constaté, comme prévu, des concentrations plus élevées dans les plantes irriguées à des concentrations élevées ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) identifiées dans le dosage comme P1 et P2.

Les résultats du tableau 12 montrent une nette tendance à l'accumulation dans les échantillons de racines pour les deux médicaments, atteignant des concentrations très élevées de l'ordre de $15.000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la carbamazépine après 30 jours d'exposition.

Cependant, dans les échantillons de feuilles, on note que la plante accumule d'abord des concentrations plus élevées des deux médicaments et qu'à mesure que l'exposition progresse, la concentration de ces médicaments diminue graduellement, disparaissant pratiquement. Ces résultats ne concordent pas avec les résultats publiés antérieurement par d'autres auteurs tels que Tanoue et al [206] et Wu. et al [207] qui ont trouvé des concentrations plus élevées de CBZ dans les feuilles que dans les racines *C. sativus* et les légumes.

Cela pourrait être dû aux dommages subis par les plantes tout au long de l'essai d'exposition, car au fil des semaines, le changement de l'état morphologique des plantes s'est fait de plus en plus sentir, les feuilles sont devenues molles et sont mortes dans les derniers jours, donc aucun médicament n'a été accumulé dans les jours précédant la fin de l'essai, puisque les plantes étaient pratiquement mortes.

Le même comportement a été observé pour le FMQ, pour toutes les concentrations dans les échantillons de feuilles, suivant une tendance exponentielle décroissante, due à l'aggravation de l'état des plantes pendant le test d'exposition.

Dans le cas des échantillons de tiges, la concentration de FMQ a montré un comportement différent, demeurant stable jusqu'à la troisième semaine et diminuant considérablement au cours des sept derniers jours, probablement en raison des dommages subis par la plante.

Comme dans le cas du CBZ, à de faibles concentrations d'irrigation, on note un comportement assez similaire à celui suivi par le FMQ, mais étonnamment en concentrations intermédiaires et élevées ($700 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) les résultats obtenus montrent une absorption maximale à 21 jours puis une diminution, ce qui est conforme au mauvais état général de la plante la dernière semaine, cependant les concentrations dans les 14 premiers jours du test étaient très faibles, par rapport aux résultats obtenus pour le FMQ ce qui suggère la difficulté des plantes, au début, à absorber CBZ.

ENR et CPR n'ont été trouvés dans aucun échantillon, probablement en raison des faibles valeurs du log P et du log Kow, de la physiologie de la plante elle-même ou de la dégradation du composé dans le sol.

DCL et IBU n'ont été trouvées dans aucun échantillon, en raison de leurs faibles valeurs en pKa, ces composés se trouvent principalement sous forme d'anions, ce qui implique une faible

absorption par les racines [208]. Ces résultats concordent avec certains articles publiés [206,209] mais Emhofer et al [210] ont trouvé des DCL inaltérées dans des racines cultivées en culture hydroponique après sept jours d'irrigation, cet écart pourrait être attribué au faible potentiel d'absorption de ces médicaments ($\log P$ et $\log K_{ow}$), à leur faible lipophilie ou même aux conditions expérimentales du projet [208].

Tableau 12. Résultats pour CBZ et FMQ d'essais d'exposition de *Lavandula dentata*.

Matrice	Niveaux	Coupe	Concentration des composés trouvés							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Feuille	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 jours	2498	38	1390	17	1156	67	2076	43
		14 jours	1672	37	545	31	631	68	468	82
		21 jours	245	13	368	61	242	34	361	35
		30 jours	150	27	207	4	150	20	62	13
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 jours	1148	68	1754	24	1556	68	1326	49
		14 jours	312	57	413	11	631	20	363	23
		21 jours	223	22	676	18	242	6	420	28
		30 jours	163	53	353	2	150	19	346	22
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 jours	141	22	145	18	111	23	220	14
		14 jours	69	10	132	8	58	0.2	70	8
		21 jours	36	8	83	12	---	---	20	4
		30 jours	24	3	21	10	---	---	---	---

* Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

Matrice	Niveaux	Coupe	Concentration des composés trouvés							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tige	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 jours	464	9	633	7	764	17	804	47
		14 jours	3837	37	1862	57	1020	45	686	16
		21 jours	3074	20	2318	37	875	14	490	35
		30 jours	15635	272	4630	113	494	27	308	14
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 jours	102	6	167	16	502	21	559	4
		14 jours	101	9	103	14	666	5	565	14
		21 jours	647	11	717	33	417	14	561	8
		30 jours	102	12	103	28	160	1	331	12
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 jours	109	25	84	39	172	14	209	7
		14 jours	101	5	156	25	151	3	184	15
		21 jours	129	8	48	18	646	19	79	20
		30 jours	54	15	49	4	335	25	57	9
Racine	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		15035	110	14076	41	1904	16	1924	16
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		1354	32	722	72	195	7	241	9
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		832	9	443	43	127	4	92	3

 * Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

2.2. *JUNCUS SP.*

Dans *Juncus sp.* on obtient des accumulations de tous les principes actifs sauf IBU, comme dans *Lavandula dentata*, les plantes exposées à de fortes concentrations, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, présentent une plus grande quantité de principes actifs que celles soumises à des concentrations intermédiaires et faibles, présentant en outre une plus grande reproductibilité entre elles. Les résultats sont présentés dans les tableaux 13 y 14.

CBZ et FMQ ont été quantifiés dans toutes les parties de la plante, CBZ à des concentrations élevées dans la tige du *Juncus sp.* Cela montre une augmentation croissante de l'accumulation jusqu'à 21 jours, stabilisée la dernière semaine d'essai, probablement parce que la plante n'était plus capable d'accumuler et métaboliser autant de CBZ. La situation inverse se produit dans le cas du FMQ, pendant les trois premières semaines, la quantité de cet ingrédient actif demeure stable sans altération majeure pour connaître une augmentation au cours de la dernière semaine d'essai, ceci pourrait être parce que cette espèce présente des difficultés dans l'absorption de cet ingrédient actif. Des résultats similaires dans les courbes d'évolution ont été obtenus avec le FMQ, à des concentrations intermédiaires et faibles, ainsi qu'à la racine, obtenant un scénario différent pour la CBZ à des concentrations de $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, où l'accumulation de celle-ci diminue durant la dernière semaine de l'essai.

Dans la racine, la CBZ enregistre les valeurs les plus élevées atteignant l'ordre de $140000 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, peut-être parce que, selon l'étude de Kodesova et al. [211], la CBZ est absorbé par des voies distinctes, l'absorption de l'eau se fait principalement par des canaux d'eau régulés ou des aquaporines, selon la demande en eau des plantes et la molécule de CBZ, non ionique est transportée principalement par un mécanisme de diffusion par les membranes des cellules racinaires, d'où des quantités élevées de CBZ se trouvent dans les racines des végétaux [211].

Dans le cas de la CPR, les plantes soumises à une solution d'irrigation de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ont montré une grande accumulation de principe actif au cours de la première semaine, produisant une diminution soudaine de la concentration trouvée dans les plantes à partir de la deuxième semaine, pour rester stable jusqu'à la fin de l'essai, ceci peut être dû aux dommages subis par les plantes pendant tout le test de l'exposition, Au fil des semaines, celles-ci ont montré un changement morphologique important dans leur condition physique, ce qui pourrait entraver l'assimilation et la métabolisation de la CPR, tandis que pour le reste des ingrédients actifs a été observé la situation inverse, augmentant leur accumulation jusqu'à la quatrième semaine du test.

L'évolution de les plants exposé à des concentrations intermédiaires et faibles de CPR est similaire, dont la courbe d'évolution tend à diminuer à mesure que les semaines augmentent.

ENR et DCL (mesurés en positif) n'ont pas été identifiés dans les plantes exposées à de faibles concentrations. Au contraire, une accumulation similaire des deux principes actifs a été observée, avec une augmentation à la fin de l'essai dans les plantes exposées à des concentrations intermédiaires de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et montrant une tendance stable dans les premières semaines, mais augmentant progressivement la quantité accumulée des deux principes actifs dans les plantes exposées à de fortes concentrations.

Enfin, dans la racine, on obtient peu de résultats significatifs et reproductibles dans les deux plantes, ce qui montre, comme dans le cas de *Lavandula dentata*, la difficulté qu'elles présentent dans l'accumulation et la rétention dans les racines des plantes.

Tableau 13. Résultats de l'accumulation de CBZ, FMQ et CPR du test d'exposition de *Juncus sp.*

Matrice	Niveaux	Coupe	Concentration des composés trouvés											
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*		CPR R1*		CPR R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tige	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 jours	2415	509	1055	3	1957	12	924	22	18994	746	10727	12309
		14 jours	8080	306	25219	18	891	131	2169	82	1802	50	1125	126
		21 jours	38895	812	39000	827	2183	170	2281	185	1300	0	1365	8
		30 jours	39879	384	39931	1499	50444	611	53201	376	1491	48	1139	11
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/P4	7 jours	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 jours	7028	118	3379	317	612	22	454	28	190	4	189	18
		21 jours	4038	196	2406	48	543	38	420	39	205	27	177	14
		30 jours	1285	55	3112	785	2903	70	3903	36	198	11	151	3
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 jours	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 jours	213	9	200	7	68	1	66	1	167	0.2	----	----
		21 jours	89	25	204	1	140	1	138	2	160	10	----	----
		30 jours	19	7	10	1	375	12	395	0.5	----	----	----	----
Racine	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		88817	5354	139321	144	41417	5786	51363	50	900	132	640	8
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		42572	4437	29020	1767	7171	1038	4612	196	----	----	----	----
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		1429	41	2873	161	96	3	183	4	----	----	----	----

* Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

Tableau 14. Résultats d'accumulation de l'ENR et du DCL de l'essai d'exposition de *Juncus sp.*

Matrice	Niveaux	Coupes	Concentration des composés trouvés							
			ENR R1*		ENR R2*		DCL+ R1*		DCL+ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tige	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 jours	627	10	1779	1716	1559	134	6606	7927
		14 jours	1455	329	3375	118	2473	131	13949	275
		21 jours	3157	240	3251	255	1598	60	1660	68
		30 jours	3986	11	4455	440	24023	555	39537	1413
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 jours	---	---	---	---	---	---	---	---
		14 jours	606	24	559	65	1429	14	619	242
		21 jours	576	6	488	64	254	7	306	41
		30 jours	662	26	590	9	377	20	632	107
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 jours	---	---	---	---	---	---	---	---
		14 jours	---	---	---	---	---	---	---	---
		21 jours	---	---	---	---	---	---	---	---
		30 jours	---	---	---	---	---	---	---	---
Racine	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		4393	445	----	----	79327	807	----	----
	700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		508	106	----	----	5696	2098	----	----
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		---	---	----	----	---	---	----	----

*Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

2.3. *SALICORNIA EUROPAEA*

Comme pour *Lavandula dentata*, les résultats d'accumulation n'ont été obtenus que pour les principes actifs CBZ et FMQ, et comme mentionné ci-dessus (2.1. *Lavandula dentata*) ces principes actifs dépendent du caractère hydrophobe ($\log P$), qui facilite leur absorption par la plante.

Des quantifications très reproductibles ont été obtenues dans des plantes dopées à des concentrations intermédiaires et élevées ($700 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ et $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) avec un comportement similaire pendant l'essai.

Cependant, à des concentrations de $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, aucune accumulation d'ingrédient actif n'a été obtenue au cours d'une semaine de l'essai, ce qui peut être comme dans les cas précédents parce que la concentration de médicaments n'était pas suffisante pour que la plante soit capable de les absorber et de les métaboliser.

L'évolution de la CBZ, montre une nette augmentation de la quantité accumulée par la plante dans la dernière semaine d'essai, montrant dans les 15 premiers jours, une stabilité sans changements, probablement après 15 jours la plante a été en mesure d'assimiler la CBZ.

Dans le cas de FMQ, nous nous trouvons dans une situation similaire, avec une forte augmentation dans la dernière semaine d'essai, bien que dans ce cas, les quantités quantifiées dans la deuxième coupe de la plante dépassent en ordre de grandeur les quantités de CBZ dans la même période de temps ce qui indique que la *Salicornia eu.* a pu absorber et métaboliser le FMQ que le CBZ.

Dans la racine de la plante seulement les deux principes actifs ont été trouvés dans les plantes exposées à des concentrations intermédiaires et élevées, montrant dans la dernière semaine d'essai, des accumulations du même ordre de grandeur que celles obtenues dans la tige de la plante, inférieures à $0.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les plantes soumises à des concentrations intermédiaires, ce qui correspond aux résultats des accumulations pour celles-ci dans la tige.

Les autres analytes n'ont pas été quantifiés dans cette matrice végétale, ce qui pourrait être du une situation analogue à celle qui s'est produite dans la *Lavandula dentata*, dans laquelle, en raison des faibles valeurs de pK_a , l'absorption par les racines des autres analytes est défectueuse.

Tableau 15. Résultats d'accumulation de CBZ et FMQ de l'essai d'exposition de *Salicornia eu.*

Matrice	Niveaux	Coupe	Concentration des composés trouvés							
			CBZ R1*		CBZ R2*		FMQ R1*		FMQ R2*	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Tige	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P1/ P2	7 jours	0.129	0.018	0.109	0.033	0.076	0.014	0.072	0.005
		14 jours	0.221	0.001	0.241	0.005	3.195	0.927	2.709	0.536
		21 jours	24.685	0.104	32.629	3.129	14.476	1.328	9.179	0.428
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P3/ P4	7 jours	0.022	0.001	0.023	0.004	0.058	0.001	----	----
		14 jours	0.042	0.0003	0.051	0.026	0.186	0.023	0.213	0.085
		21 jours	12.054	0.897	10.124	0.105	0.502	0.053	0.787	0.533
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ P5/ P6	7 jours	----	----	----	----	----	----	----	----
		14 jours	----	----	----	----	----	----	----	----
		21 jours	----	----	----	----	----	----	----	----
Racine	10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		11.105	0.593	9.982	0.753	13.435	2.911	11.661	0.912
	700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		0.517	0.088	0.394	0.049	0.421	0.228	0.4035	0.145
	10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		----	----	----	----	----	----	----	----

* Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

3. CONTENU D'AZOTE DANS LES ÉCHANTILLONS DE TERREAU

Lorsque les plantes n'ont pas un apport équilibré et qu'il y a un manque d'azote, les anomalies sont observables au travers de son développement et sa morphologie. Certains de ces effets sont par exemple une croissance beaucoup plus lente, les feuilles jaunissent peu à peu à partir de la partie inférieure de la plante (chlorose), elles ont moins de défenses contre les fléaux et les maladies et une défoliation peut apparaître. D'autre part, l'excès d'azote dans les plantes a également un effet néfaste sur elles en réduisant leur production et la qualité des fleurs. Ces excès sont reconnaissables à l'observation des symptômes suivants : feuillage excessif de la plante, tiges faibles, feuilles en forme de griffes face au sol, mauvaise ouverture des bourgeons, feuilles vertes très intenses ou peu résistantes aux insectes en général.

Le tableau 16 suivant montre les résultats obtenus à partir de la teneur totale en azote dans les substrats des différentes concentrations et matrices végétales.

Tableau 16. Pourcentage d'azote obtenu dans les différents substrats des matrices végétales.

Échantillon	Concentration	%N
<i>Lavandula dentata</i>	10 mg·L ⁻¹	1.6 (0.2)
	700 µg·L ⁻¹	1.4 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	0.7 (0.1)
<i>Juncus sp.</i>	10 mg·L ⁻¹	1.7 (0.3)
	700 µg·L ⁻¹	1.1 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	0.8 (0.1)
<i>Salicornia eu.</i>	10 mg·L ⁻¹	1.8 (0.2)
	700 µg·L ⁻¹	1.4 (0.1)
	10 µg·L ⁻¹	1.1 (0.1)

La teneur en azote du substrat de *Lavandula dentata* augmente en fonction de la concentration à laquelle les plantes ont été exposées pendant l'essai d'exposition, de sorte qu'une partie de cette teneur en azote provient des groupes amino et amide des médicaments contenant de l'azote, tous sauf l'ibuprofène. La même situation est observée dans les échantillons de substrat de *Juncus sp.* le pourcentage d'azote diminue à mesure que la concentration des analytes auxquels les plantes ont été soumises diminue. Ces deux matrices végétales ont été cultivées dans un substrat universel, dont la teneur en azote oscille entre 0.7-1 % [212] ce qui indique qu'une partie de l'azote obtenu dans le substrat des deux plantes provient des médicaments administrés lors des tests d'exposition.

Dans le cas de *Salicornia eu.*, la plante est cultivée dans un substrat de fibres de coco parce qu'il s'agit d'une plante halophile comme mentionné ci-dessus, il a une teneur élevée en sel, car il est formé par les fibres de coco, la teneur en azote dans ces substrats est de 1.2 % [213], un pourcentage similaire à celui obtenu dans les plantes soumises à de faibles concentrations lors des essais d'exposition et qui atteint 1.8 % dans les échantillons de substrat de plantes exposées à une concentration en matière active de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Ces résultats sont dans une certaine mesure corrélés avec ceux obtenus dans les accumulations des différents principes actifs dans les plantes, étant graduels la quantité d'analytes trouvés aux différentes concentrations, ce qui justifie l'absorption produite à fortes concentrations et la faible ou l'absence d'accumulation dans la majorité des plantes exposées à de faibles concentrations. Les valeurs d'azote coïncidant dans l'essai d'exposition à faible concentration avec celles bibliographiquement référencées dans les substrats utilisés pour la culture des plantes, appuient la thèse d'une absorption moindre des médicaments dans le substrat et donc dans la plante $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

D'autre part, ils garantissent l'état d'évolution des plantes, celles exposées à de faibles concentrations n'ont guère subi de modifications physiques, contrairement à celles exposées à des concentrations de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ qui sont mortes à la fin de l'essai.

4. POSSIBLES MÉTABOLITES DÉTECTÉS DANS LES PLANTES TESTÉES

Les résultats obtenus en appliquant le logiciel MetaboLynx aux extraits analysés pour les différentes parties des plantes lors des tests d'exposition sont présentés ci-dessous. De cette façon, la présence de métabolites et/ou de produits de dégradation possibles liés aux différents analytes fournis lors des tests d'exposition peut être détectée. L'objectif est d'établir des corrélations entre les composés identifiés, l'état de la plante et les niveaux trouvés des principes actifs fournis. En outre, l'influence possible des espèces végétales étudiées sera analysée. Les résultats sont présentés dans des sections dans lesquelles les principaux métabolites possibles pour chaque matière active et plante étudiée sont recueillis.

Les résultats sont présentés dans des sections dans lesquelles les principaux métabolites possibles pour chaque matière active et plante étudiée sont recueillis. L'annexe I présente les tableaux explicatifs des voies métaboliques obtenues par le logiciel MetaboLynx lors du traitement des échantillons de *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia europaea*, avec chacun des principes actifs, ainsi que la masse trouvée, la masse théorique, l'erreur, la formule empirique et le temps de rétention en minutes.

Les tableaux correspondant à l'analyse de *Lavandula dentata* montrent les métabolites possibles de deux plantes (les valeurs des duplicatas séparés par des barres dans la même cellule sont indiquées dans un cas positif dans les deux répliques, comme dans *Salicornia eu.*), obtenues dans les quatre coupes réalisées (7, 14, 21 et 30 jours). Les résultats sont différenciés par couleur selon la partie de la plante analysée: vert pour la feuille, marron pour la tige et en noire la racine.

Dans le cas de *Juncus sp.*, les tableaux montrent les résultats de deux plantes aux trois niveaux de concentration de l'eau d'irrigation utilisés dans les échantillons de tiges (4 coupes effectuées à 7, 14, 21 et 30 jours) et de racines (fin de l'essai, après 30 jours d'exposition). Les échantillons ont été analysés en double et les valeurs obtenues dans chaque réplique, séparées par des barres, ont été recueillies dans les tableaux (dans le cas d'un réplique négatif, une seule donnée apparaît dans la cellule correspondant au métabolite correspondant).

En *Salicornia eu.* les résultats correspondent à l'analyse de six plantes à chacun des trois niveaux de concentration utilisés, dans des échantillons de tiges (3 coupes effectuées à 7, 14 et 21 jours) et de racines (fin de l'essai, après 21 jours d'exposition). Dans la plupart des cas, la petite quantité d'échantillon disponible ne permettait pas une analyse en double.

4.1. CARBAMAZÉPINE DANS *LAVANDULA DENTATA*

Le tableau 17 montre les résultats obtenus après traitement par le logiciel MetaboLynx des métabolites possibles trouvés dans les échantillons de *Lavandula dentata* exposés à la carbamazépine. En vert sont montrés les résultats correspondant au traitement des feuilles de cette plante dans les différentes coupes, en marron des tiges correspondantes, et en noir, les possibles métabolites trouvés lors du traitement des échantillons de racines.

Le nombre de métabolites détectés diminue directement avec la concentration des dilutions des tests d'exposition, et les voies métaboliques possibles impliquées peuvent être consultées en détail dans les tableaux correspondants en annexe.

On peut voir que c'est la racine de la plante qui accumule le plus de métabolites possibles, étant la voie métabolique de la double hydroxylation avec perte du fragment $-CHNO$, qui correspond au métabolite CBZ-L 8, le plus fréquent. Ce métabolite apparaît dans toutes les concentrations testées, ainsi que dans les échantillons de tige exposés à des concentrations intermédiaires de dissolution ($700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dans la plante P4, mais pas dans sa réplique (plante P3).

Le métabolite CBZ-L 2, dérivé d'une distillation avec perte du fragment $-CHNO$ et apparaissant à un temps de rétention de 11.29 minutes, prédomine dans les échantillons de tiges, particulièrement dans les plantes qui ont été exposées à de fortes concentrations de dissolution (P1), et ce, dans les deux échantillons exposés.

La route métabolique de la double hydroxylation avec perte du groupe –HN, conduit au métabolite CBZ-L 12, qui apparaît dans toute la plante, est abondant chez les personnes exposées à de fortes concentrations de dissolution, sa quantité étant plus faible aux concentrations intermédiaires et faibles.

Tableau 17. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec la carbamezépine.

(En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CBZ-L 9	1054	CBZ-L 11	1057	CBZ-L 2	5180	CBZ-L 2	3671	CBZ-L 8	1135
				CBZ-L 14	1029	CBZ-L 6	1952				
				CBZ-L 6	1737						
	P1			CBZ-L 11	1037	CBZ-L 6	1948	CBZ-L 2	3581	CBZ-L 12	236
				CBZ-L 9	1249	CBZ-L 2	4892				
				CBZ-L 2	1679						
				CBZ-L 6	1737						
	P2	*		CBZ-L 12	620					CBZ-L 8	1391
	P2	*		CBZ-L 12	705					CBZ-L 8	1543
		*								CBZ-L 1	7322
*									CBZ-L 7	977	
700 µg/L	P3	*								CBZ-L 8	3928
		*									
	P3	*									
		*									
	P4	*				CBZ-L 15	1774			CBZ-L 8	2363
		*				CBZ-L 7	1103			CBZ-L 5	7088
		*				CBZ-L 8	542			CBZ-L 13	1123
	P4	*				CBZ-L 8	348			CBZ-L 8	6270
		*				CBZ-L 4	3950			CBZ-L 5	7818
	10 µg/L	P5	*		CBZ-L 10	2772	CBZ-L 2	1385	CBZ-L 12	251	CBZ-L 8
*								CBZ-L 15	774	CBZ-L 3	227
P5		*		CBZ-L 10	3150			CBZ-L 15	782		
		*									
		*									
		*									
P6		*								CBZ-L 8	1664
		*								CBZ-L 5	2405
		*									
P6		*								CBZ-L 8	1205
	*										

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.2. FLUMÉQUINE DANS *LAVANDULA DENTATA*

Le tableau 18 énumère les métabolites possibles obtenus à partir du test d'exposition *Lavandula dentata* avec la fluméquine.

Dans la deuxième coupe de la plante équivalente à la deuxième semaine d'essai, on observe le plus grand nombre possible de métabolites, en particulier dans les échantillons de feuilles. Il convient également de noter que seuls des métabolites possibles ont été trouvés dans les feuilles des plantes de la première coupe, exposées à une concentration élevée de fluméquine.

La voie métabolique correspondant à l'hydratation avec perte d'un atome de fluor et addition d'un atome d'hydrogène donne naissance au métabolite FMQ-L 20, avec un temps de rétention de 11.07 minutes qui est dans les échantillons de tiges et de feuilles après 15 jours d'essai, quelle que soit la concentration à laquelle les plantes ont été soumises, atteignant des quantités supérieures à 6500 u.a. De faibles concentrations ne sont pas observées après la deuxième coupe.

Le métabolite FMQ-L 30 correspondant à une hydroxylation, avec un temps de rétention de 14.42 minutes, se trouve à la fois dans la racine et dans certains des échantillons de feuilles correspondant aux première et deuxième coupes de *Lavandula dentata*, diminuant la quantité trouvée, à mesure que la concentration à laquelle les plantes ont été soumises dans le test d'exposition diminue.

Dans la racine, le métabolite FMQ-L 7 se trouve à toutes les concentrations testées, correspondant à une déshydratation des alcools avec perte d'un atome de fluor et addition d'un atome d'hydrogène, à un temps de rétention de 12.67 minutes avec une masse théorique et trouvée de 225.0790 et 226.0858 respectivement, atteignant des quantités entre 560 et 1700 u.a. dans toutes les concentrations auxquelles le test est effectué.

En général, les plantes soumises à de faibles concentrations dans l'essai d'exposition (plantes P5 et P6), présentent une faible formation de métabolites, sauf dans la deuxième coupe de la plante, comme la plupart d'entre elles le sont dans les plantes utilisées comme témoins, la situation inverse est celle des plantes exposées à de fortes concentrations (P1). L'absence de métabolites dans la majorité de ces plantes pourrait être liée à leur état, à mesure qu'elles s'aggravent au fil des semaines d'essai, devenant pratiquement mortes à la fin. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par l'accumulation des principes actifs de la carbamazépine et de la fluméquine dans les matrices des feuilles et de la tige de *Lavandula dentata*, avec des accumulations plus importantes dans la deuxième semaine de l'essai.

Tableau 18. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec la fluméquine.
(En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	FMQ-L 11	941	FMQ-L 3	875					FMQ-L 7	1135
		FMQ-L 19	656	FMQ-L 31	176						
		FMQ-L 28	1121								
		FMQ-L 30	2438								
	P1			FMQ-L 22	395					FMQ-L 2	2029
	P2	*		FMQ-L 12	1115	FMQ-L 15	3074			FMQ-L 7	1391
		*		FMQ-L 24	555	FMQ-L 19	1847				
	P2	*		FMQ-L 6	322	FMQ-L 15	2825	FMQ-L 15	1538	FMQ-L 2	2779
		*		FMQ-L 18	364/354	FMQ-L 19	3376	FMQ-L 19	3443	FMQ-L 7	1543
		*				FMQ-L 20	2037	FMQ-L 20	1823		
700 µg/L	P3	*		FMQ-L 8	5819			FMQ-L 3	975	FMQ-L 30	522
		*		FMQ-L 9	18324			FMQ-L 24	505		
		*		FMQ-L 10	6151			FMQ-L 25	528		
		*		FMQ-L 14	1437						
	P3	*		FMQ-L 1	32476			FMQ-L 26	685	FMQ-L 6	3929
		*		FMQ-L 8	4777			FMQ-L 27	184	FMQ-L 7	607
		*		FMQ-L 10	5712						
		*		FMQ-L 14	2639						
	P4	*				FMQ-L 19	1878	FMQ-L 15	5997	FMQ-L 4	1150
		*				FMQ-L 23	5584	FMQ-L 9	21124	FMQ-L 6	6270
		*						FMQ-L 19	4556		
		*						FMQ-L 20	3685		
	P4	*		FMQ-L 1	71565	FMQ-L 15	1700			FMQ-L 6	2363
		*		FMQ-L 9	69823	FMQ-L 19	2154				
		*		FMQ-L 15	8784	FMQ-L 20	1063				
		*		FMQ-L 19	6916	FMQ-L 21	2012				
		*		FMQ-L 20	4752	FMQ-L 23	5965				
		*				FMQ-L 29	254				
10 µg/L	P5	*		FMQ-L 8	7657	FMQ-L 19	725	FMQ-L 8	639		
		*		FMQ-L 9	21799			FMQ-L 14	568		
		*		FMQ-L 10	6314			FMQ-L 16	464		
		*		FMQ-L 15	9912			FMQ-L 23	1827		
		*		FMQ-L 17	2195						
		*		FMQ-L 19	4917						
		*		FMQ-L 20	2550						
		*		FMQ-L 30	1678						
	P5	*		FMQ-L 6	2190			FMQ-L 27	724	FMQ-L 5	1357
		*		FMQ-L 9	60955			FMQ-L 13	420	FMQ-L 7	563
		*		FMQ-L 10	11080						
		*		FMQ-L 15	10755						
		*		FMQ-L 19	11778						
		*		FMQ-L 20	6590						
		*		FMQ-L 9	30680						
		*		FMQ-L 15	4191						
	P6	*		FMQ-L 19	5859						
		*		FMQ-L 20	3865						
		*		FMQ-L 3	958					FMQ-L 7	1205
		*		FMQ-L 30	594					FMQ-L 30	540
	P6	*		FMQ-L 29	197	FMQ-L 1	26229			FMQ-L 6	1665
		*		FMQ-L 30	649	FMQ-L 15	3441			FMQ-L 7	1625
		*		FMQ-L 1	74607	FMQ-L 19	4780				
		*		FMQ-L 9	53128						
		*		FMQ-L 15	5107						
		*		FMQ-L 19	8311						
		*		FMQ-L 20	5579						

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.3. CIPROFLOXACINE DANS *LAVANDULA DENTATA*

Le tableau 19 montre les métabolites possibles obtenus dans les échantillons de *Lavandula dentata* soumis à des tests d'exposition avec la ciprofloxacine.

On observe, tout d'abord, que dans la première coupe de la plante correspondant à la première semaine du test d'exposition, seuls des métabolites apparaissent dans les feuilles d'une plante exposée à de fortes concentrations du médicament. Les échantillons de la troisième coupe, tiges et feuilles, montrent le plus grand nombre de métabolites, surtout aux concentrations élevées et intermédiaires de solutions d'irrigation.

Les voies métaboliques de l'acétylation avec perte d'un fragment $-C_3H_4$, proviennent, entre autres, des métabolites CPR-L 36 et CPR-L 37 avec la même masse théorique 333,1125 m/z, la même formule empirique $C_{16}H_{16}FN_3O_4$ mais des temps de rétention différents, 4.78 et 5.62 minutes respectivement. Ces métabolites se forment dans les tiges et les feuilles des plantes soumises à des concentrations élevées, intermédiaires et faibles (P1, P4 et P5), pendant les quatre semaines de l'essai, et ont atteint des quantités supérieures à 27000 u.a. à 30 jours de l'essai.

Le métabolite CPR-L 1, formé à partir de la molécule mère avec perte de fragment $-C_4H_8N_2$, prédomine dans les échantillons de tiges de *Lavandula dentata* quelle que soit la semaine du test et la concentration à laquelle la plante a été exposée, bien qu'on le trouve également dans des échantillons de feuilles de la plante P5 soumises à de faibles concentrations.

Dans la racine de toutes les plantes, quelle que soit la concentration de dissolution dopante à laquelle elles ont été exposées, se trouve le métabolite CPR-L 48, qui est affecté à une acétylation avec perte d'un atome de fluor et addition d'un atome d'hydrogène. D'autre part, la formation du métabolite CPR-L 5, avec une formule empirique de $C_{14}H_{14}FN_3O_2$ et un temps de rétention de 3.19 minutes, provient uniquement de plantes exposées à des concentrations intermédiaires et élevées. Il est remarquable le nombre élevé de métabolites présents dans les racines de toutes les plantes à la fin du test d'exposition. Une description détaillée des mécanismes impliqués dans la formation des différents métabolites détectés figure dans les tableaux correspondants de l'annexe I.

Tableau 19. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec la ciprofloxacine.
(En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CPR-L 8	1228	CPR-L 9	1996	CPR-L 36	27639	CPR-L 36	27662	CPR-L 15	855
		CPR-L 36	15049	CPR-L 19	596	CPR-L 37	7697			CPR-L 28	221
				CPR-L 36	4531	CPR-L 43	13704			CPR-L 30	908
				CPR-L 43	5525					CPR-L 44	453
				CPR-L 41	2784					CPR-L 45	3833
										CPR-L 46	924
	P1									CPR-L 48	34008
				CPR-L 4	584					CPR-L 12	1335
				CPR-L 7	5390					CPR-L 31	4223
				CPR-L 19	634					CPR-L 46	825
	P2	*								CPR-L 48	18708
		*		CPR-L 12	223	CPR-L 40	5659	CPR-L 1	3074	CPR-L 5	904
		*						CPR-L 3	3184	CPR-L 24	1450
		*						CPR-L 40	14111	CPR-L 26	629
		*						CPR-L 43	15064	CPR-L 35	999
700 µg/L	P3									CPR-L 48	17309
		*		CPR-L 21	4765	CPR-L 1	2825	CPR-L 1	1538	CPR-L 5	1560
		*				CPR-L 6	100752	CPR-L 6	54446	CPR-L 48	17178
	P3	*				CPR-L 43	16685	CPR-L 40	10265		
		*									
		*									
		*									
		*									
	P4	*		CPR-L 2	8508	CPR-L 17	4936			CPR-L 5	1575
		*		CPR-L 43	11890	CPR-L 18	3802			CPR-L 11	645
		*				CPR-L 29	4788			CPR-L 48	12501
		*				CPR-L 17	4939			CPR-L 5	1349
		*				CPR-L 18	2438			CPR-L 12	1415
	P4	*								CPR-L 20	3609
		*								CPR-L 23	10703
		*								CPR-L 46	1041
		*								CPR-L 48	12285
		*		CPR-L 1	8784	CPR-L 10	3124	CPR-L 1	5997	CPR-L 27	2572
	P4	*		CPR-L 9	3595	CPR-L 21	3660	CPR-L 6	69785	CPR-L 35	1525
		*		CPR-L 43	9570	CPR-L 36	11415	CPR-L 40	21112	CPR-L 39	1167
		*				CPR-L 36	5361	CPR-L 42	10684	CPR-L 48	8281
		*				CPR-L 37	3071				
		*				CPR-L 41	6996				
	P4	*		CPR-L 14	27330	CPR-L 3	2058			CPR-L 12	1149
		*		CPR-L 32	1881	CPR-L 9	987			CPR-L 25	1290
		*				CPR-L 16	2694			CPR-L 26	1492
		*				CPR-L 19	883			CPR-L 27	2452
		*				CPR-L 36	12126			CPR-L 39	1158
10 µg/L	P5	*				CPR-L 36	5109			CPR-L 47	587
		*				CPR-L 37	3168			CPR-L 48	10024
		*				CPR-L 38	2643				
		*		CPR-L 1	10755			CPR-L 6	55300	CPR-L 16	1388
		*		CPR-L 14	37517			CPR-L 9	890/1689	CPR-L 33	1131
	P5	*						CPR-L 36	3326	CPR-L 48	12421
		*						CPR-L 40	12428		
		*						CPR-L 43	4133		
		*		CPR-L 1	4191	CPR-L 9	687	CPR-L 9	665	CPR-L 12	1095
		*		CPR-L 9	3999	CPR-L 36	3020	CPR-L 36	3180	CPR-L 13	2364
	P6	*		CPR-L 25	1956	CPR-L 37	2135	CPR-L 37	2241	CPR-L 33	1047
		*		CPR-L 34	3695					CPR-L 48	12413
		*		CPR-L 42	6623						
		*		CPR-L 1	5107	CPR-L 43	33061			CPR-L 22	420
		*								CPR-L 25	621
	P6	*								CPR-L 35	526
		*								CPR-L 48	6024
		*								CPR-L 49	904
		*		CPR-L 12	202					CPR-L 12	1179
		*		CPR-L 13	739					CPR-L 22	455
	P6	*		CPR-L 18	1744					CPR-L 35	745
		*		CPR-L 22	857					CPR-L 48	8593

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.4. ENROFLOXACINE DANS *LAVANDULA DENTATA*

Le tableau 20 montre les métabolites possibles trouvés dans les plantes exposées à l'enrofloxacin. On observe tout d'abord que dans la première coupe des plantes, aucun métabolite n'est trouvé, alors que dans la deuxième coupe, équivalente aux 15 jours d'essai, un nombre significatif de métabolites possibles apparaît. Les plantes soumises à une forte concentration d'enrofloxacin dans l'eau d'irrigation, le nombre de métabolites diminue drastiquement à la troisième coupe (seulement dans la tige) et n'apparaissent même pas à la dernière coupe, ce qui pourrait être lié à un dysfonctionnement important dans la physiologie des plantes soumises à ces fortes concentrations de principe actif. Une description des mécanismes impliqués dans la formation des différents métabolites détectés figure dans les tableaux correspondants de l'annexe I.

Le métabolite ENR-L 16 correspondant à une voie métabolique de distillation avec perte du fragment $-C_2H_2$, provient des échantillons de feuilles quelle que soit la concentration à laquelle la plante est soumise, bien qu'il apparaisse à différents moments du dosage en fonction de la concentration de la solution d'irrigation. Le métabolite ENR-L 4, avec une masse théorique de 217.0539 m/z et un temps de rétention de 8.81 minutes, se trouve à partir de la deuxième semaine d'essai, dans des feuilles des deux répliques, avec des ordres de grandeur similaires, sauf dans des plantes P1 soumises à de fortes concentrations.

Les voies métaboliques correspondant à la perte d'un atome de fluor et à l'addition d'un atome d'hydrogène génèrent les métabolites ENR-L 34 et ENR-L 35 avec des temps de rétention différents mais des masses théoriques identiques. Les deux métabolites apparaissent à partir de la deuxième coupe de tige jusqu'à la fin de l'essai, prédominant dans les échantillons soumis à des concentrations faibles et intermédiaires (plantes P5 et P4).

La voie métabolique de déshydratation des alcools avec perte du groupe $-C_2H_4$, le métabolite ENR-L 20 est formé, généré principalement dans la racine de la plante dans les échantillons exposés à une concentration de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (P6) et dans les feuilles de *Lavandula dentata* exposées à la même concentration pendant la seconde coupe, correspondant aux 15 jours de l'essai.

Dans la racine, les métabolites ENR-L 37 et ENR-L 48 se forment dans les plantes exposées à des concentrations élevées (P1 et P2) et faibles (P5), atteignant plus de 4000 u.a. dans les racines des plantes P1 et P2, tandis que le métabolite ENR-L 37, qui correspond à une réduction avec perte d'un atome de fluor et addition d'hydrogène, diminue progressivement, comme la concentration en dissolution à laquelle les plantes ont été exposées diminue.

Tableau 20. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec l'enrofloxacin. (En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1			ENR-L 7	5390	ENR-L 28	1069			ENR-L 3	2295
				ENR-L 16	634					ENR-L 37	10377
				ENR-L 21	541					ENR-L 46	2530
				ENR-L 27	884					ENR-L 48	1976
				ENR-L 8	1996						
				ENR-L 9	983						
				ENR-L 31	7807						
				ENR-L 34	8646						
				ENR-L 35	7905						
				ENR-L 39	4448						
				ENR-L 50	3187						
				ENR-L 51	2704						
	P1			ENR-L 16	596						
				ENR-L 19	6796						
				ENR-L 34	559						
	P2	*		ENR-L 1	1117	ENR-L 11	9319			ENR-L 37	24758
		*		ENR-L 4	6627	ENR-L 30	5659			ENR-L 46	4799
		*		ENR-L 26	5689	ENR-L 31	9638			ENR-L 48	4456
		*		ENR-L 36	1323						
		*		ENR-L 55	743						
	P2	*		ENR-L 4	5780	ENR-L 6	3184			ENR-L 37	22789
		*		ENR-L 29	1375	ENR-L 30	14111			ENR-L 46	5170
		*				ENR-L 47	6499			ENR-L 48	4010
700 µg/L	P3	*						ENR-L 14	2438	ENR-L 3	2322
		*						ENR-L 27	5326	ENR-L 25	1067
		*						ENR-L 56	349		
	P3	*						ENR-L 4	5806		
		*						ENR-L 43	639		
	P4	*		ENR-L 5	8784	ENR-L 4	3540	ENR-L 32	707	ENR-L 14	687
		*		ENR-L 23	11798	ENR-L 14	1887	ENR-L 53	846	ENR-L 15	4857
		*		ENR-L 34	12662	ENR-L 16	1081	ENR-L 30	21112	ENR-L 20	827
		*		ENR-L 35	2508	ENR-L 17	4055	ENR-L 42	26057	ENR-L 22	1290
		*		ENR-L 54	17093	ENR-L 21	1774			ENR-L 26	11611
		*				ENR-L 31	9220			ENR-L 40	472
		*				ENR-L 38	2106			ENR-L 46	1856
		*				ENR-L 34	8540				
		*				ENR-L 35	2902				
		*				ENR-L 51	2117				
	P4	*				ENR-L 4	3086	ENR-L 26	449	ENR-L 11	944
		*				ENR-L 17	4542	ENR-L 53	1246	ENR-L 15	4391
		*				ENR-L 21	911			ENR-L 26	10832
		*				ENR-L 31	9158				
		*				ENR-L 34	6069				
10 µg/L	P5	*						ENR-L 17	2102	ENR-L 11	945
		*						ENR-L 31	9934	ENR-L 37	6892
		*						ENR-L 34	11329	ENR-L 46	2008
		*						ENR-L 35	2930	ENR-L 48	1117
		*						ENR-L 39	1774		
		*						ENR-L 44	718		
	P5	*		ENR-L 2	10994	ENR-L 8	687	ENR-L 9	1040	ENR-L 37	6280
		*		ENR-L 5	4191	ENR-L 13	357	ENR-L 13	1823	ENR-L 46	2461
		*		ENR-L 33	2059	ENR-L 17	2157	ENR-L 21	1042	ENR-L 48	1167
		*		ENR-L 34	13818	ENR-L 31	9568	ENR-L 23	8073		
		*		ENR-L 52	13918	ENR-L 34	13235	ENR-L 31	10183/10115		
		*				ENR-L 35	2813	ENR-L 34	4778		
		*				ENR-L 45	10183	ENR-L 35	6062		
		*				ENR-L 51	1486	ENR-L 39	2726		
	P6	*						ENR-L 41	1072		
		*						ENR-L 49	7977		
		*		ENR-L 2	11874	ENR-L 27	8614			ENR-L 3	1299
		*		ENR-L 8	2948	ENR-L 23	10033			ENR-L 15	3009
		*		ENR-L 52	13566	ENR-L 31	11650			ENR-L 18	4034
		*		ENR-L 4	6649	ENR-L 42	7205			ENR-L 20	420
	P6	*		ENR-L 14	1607					ENR-L 25	1010
		*		ENR-L 16	910						
		*		ENR-L 4	6713					ENR-L 11	1179
		*		ENR-L 12	739					ENR-L 15	2939
		*		ENR-L 14	1744					ENR-L 18	4230
		*		ENR-L 20	857					ENR-L 20	455
		*		ENR-L 32	570						
		*		ENR-L 36	5646						
		*		ENR-L 57	470						

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.5. DICLOFÉNAC DANS *LAVANDULA DENTATA*

Dans le tableau 21, les métabolites possibles du diclofénac obtenus dans la tige, la feuille et la racine de *Lavandula dentata* sont collectés ; on observe d'abord l'absence de métabolites dans toute partie de la plante après la première semaine d'essai, sauf dans les feuilles des plantes irriguées avec dilution à une concentration supérieure, et lorsque le nombre de métabolites augmente considérablement entre les 15 jours de l'essai (deuxième coupe) et la troisième semaine de l'essai, puis augmente encore à 30 jours. Le nombre de métabolites possibles détectés dans les échantillons de racines à la fin de l'essai est extraordinairement inférieur à celui des feuilles et des tiges à tous les stades de l'essai, à l'exception de la première semaine.

Le métabolite DCL-L 4 (fruit de la perte d'un hydroxyméthylène) se trouve dans les feuilles des plantes irriguées avec des concentrations élevées et faibles de solution d'irrigation (P1, P2 et P6) dans la deuxième coupe, mais pas dans celles irriguées à concentrations intermédiaires.

La voie métabolique à partir du composé d'origine avec perte d'un fragment $-C_6H_3NCl_2$ provient du métabolite DCL-L 10, identifié à la fois dans la tige et dans la feuille de *Lavandula dentata* à toutes les concentrations auxquelles la plante a été irriguée, dominant dans la troisième coupe aux concentrations intermédiaires et faibles et atteignant plus de 60000 u.a., tandis que le métabolite DCL-L 14, avec la même voie métabolique mais un temps et une masse de rétention différents, prédomine dans la quatrième coupe de la plante correspondant à la dernière semaine d'essai. Aucun de ces composés n'a été identifié dans la racine d'aucune plante à la fin de l'essai.

Le métabolite DCL-L 21, provenant d'une hydroxylation avec perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$ se trouve dans les feuilles de *Lavandula dentata* dans la deuxième coupe, ainsi que dans les feuilles et la tige de la même de 21 jours d'essai, à la fois en intermédiaire et en faibles concentrations de dissolution administrées, pour atteindre des quantités plus élevées dans les plantes irriguées avec la dilution la plus diluée.

Le métabolite DCL-L 5, avec voie métabolique de déméthylation et perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$, a été identifié dans des échantillons de feuilles tout au long du dosage, avec des pics chromatographiques, en général, de très grandes zones.

Dans la racine, la formation du métabolite DCL-L 24 est observée à toutes les concentrations, provenant d'une hydratation avec perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$. Il est à noter ici qu'en général, le nombre de métabolites possibles détectés dans la racine est sensiblement inférieur à ceux identifiés chez les *Lavandula dentata* irriguées avec d'autres principes actifs.

Tableau 21. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec le diclofénac.
(En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	DCL-L 7	15702	DCL-L 1	14509	DCL-L 1	43028	DCL-L 14	81369	DCL-L 24	3099
		DCL-L 14	65927	DCL-L 6	7391	DCL-L 14	84973	DCL-L 15	42472		
		DCL-L 20	40245	DCL-L 15	24981	DCL-L 15	74435	DCL-L 20	97287		
		DCL-L 10	21265	DCL-L 41	837	DCL-L 22	151364	DCL-L 21	16002		
		DCL-L 11	9971	DCL-L 48	1113	DCL-L 34	61655	DCL-L 37	819		
		DCL-L 12	6931	DCL-L 4	97424	DCL-L 36	2386	DCL-L 41	1196		
		DCL-L 13	9806	DCL-L 40	549	DCL-L 49	2025	DCL-L 8	13847		
	P1					DCL-L 8	27847				
		DCL-L 33	7120	DCL-L 4	132624	DCL-L 10	11690	DCL-L 9	101538		
	P2	*		DCL-L 47	272						
		*		DCL-L 4	38845	DCL-L 44	112			DCL-L 24	4959
700 µg/L	P2	*				DCL-L 46	160				
		*		DCL-L 4	33249						
		*		DCL-L 5	170372			DCL-L 4	52951	DCL-L 24	1775
		*		DCL-L 16	23820			DCL-L 15	22094		
	P3	*		DCL-L 21	46723			DCL-L 16	19131		
		*		DCL-L 30	9135			DCL-L 17	4038		
		*		DCL-L 43	2155			DCL-L 21	161585		
		*		DCL-L 11	29032			DCL-L 32	3090		
		*		DCL-L 12	18174			DCL-L 10	61667		
		*		DCL-L 20	1363			DCL-L 11	30839		
		*		DCL-L 40	655			DCL-L 12	23040		
		*		DCL-L 5	209522			DCL-L 4	52222	DCL-L 24	1894
	P3	*		DCL-L 16	23589			DCL-L 5	201473		
		*		DCL-L 21	47124			DCL-L 15	22318		
		*		DCL-L 43	3163			DCL-L 16	12716		
		*		DCL-L 11	27667			DCL-L 21	149078		
		*		DCL-L 12	17930			DCL-L 32	2331		
		*		DCL-L 39	13847			DCL-L 10	59313		
		*						DCL-L 11	32222		
		*						DCL-L 12	23373		
	P4	*		DCL-L 5	23553	DCL-L 1	16061	DCL-L 2	7172	DCL-L 23	964
		*		DCL-L 21	10512	DCL-L 2	29443	DCL-L 14	32605	DCL-L 27	2214
		*		DCL-L 25	8268	DCL-L 14	19339	DCL-L 15	30864	DCL-L 50	807
		*		DCL-L 43	3322	DCL-L 15	10109	DCL-L 19	2904		
		*		DCL-L 10	62712	DCL-L 5	45932	DCL-L 29	772		
		*		DCL-L 11	26597	DCL-L 20	20113	DCL-L 40	306		
		*		DCL-L 12	17176	DCL-L 21	14537				
		*		DCL-L 28	12737	DCL-L 3	2175				
	P4	*		DCL-L 31	8726	DCL-L 10	33349				
		*		DCL-L 40	712	DCL-L 10	29568				
		*				DCL-L 35	2488				
		*		DCL-L 25	7923	DCL-L 1	14990	DCL-L 14	26865	DCL-L 23	1093
		*		DCL-L 10	73843	DCL-L 21	11357	DCL-L 15	32482	DCL-L 50	845
		*		DCL-L 11	31353	DCL-L 5	32512	DCL-L 29	570		
		*		DCL-L 12	20779	DCL-L 14	35275				
		*		DCL-L 18	37	DCL-L 21	25946				
	P4	*		DCL-L 28	13734	DCL-L 22	452				
		*		DCL-L 40	878	DCL-L 32	5325				
		*				DCL-L 3	2114				
		*				DCL-L 10	34119				
		*				DCL-L 10	29868				
		*				DCL-L 39	1212				
		*				DCL-L 39	6314				
		*		DCL-L 21	82578	DCL-L 14	19955	DCL-L 1	14555	DCL-L 23	1246
10 µg/L	P5	*		DCL-L 3	1485	DCL-L 15	37063	DCL-L 14	21419	DCL-L 24	1877
		*		DCL-L 8	53786	DCL-L 45	490	DCL-L 15	17839		
		*		DCL-L 10	67278	DCL-L 9	54604	DCL-L 3	2452		
		*		DCL-L 11	62839			DCL-L 10	23462		
		*		DCL-L 12	43204			DCL-L 34	19157		
		*		DCL-L 13	23393						
	P5	*		DCL-L 39	14534						
		*		DCL-L 5	186849			DCL-L 1	16708	DCL-L 24	1774
		*		DCL-L 8	62235			DCL-L 3	2210	DCL-L 42	2607
		*		DCL-L 17	4548			DCL-L 14	21268		
		*		DCL-L 21	85356			DCL-L 15	20153		
		*		DCL-L 10	64174			DCL-L 21	35011		
		*		DCL-L 11	65885						
		*		DCL-L 12	41186						
	P6	*		DCL-L 13	24537						
		*		DCL-L 39	13101						
		*		DCL-L 4	77052					DCL-L 24	4574
	P6	*		DCL-L 26	3058					DCL-L 38	318
		*		DCL-L 32	3320					DCL-L 42	1416
		*		DCL-L 4	75458					DCL-L 24	4633
	P6	*								DCL-L 42	1515

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.6. IBUPROFÈNE DANS *LAVANDULA DENTATA*

Le tableau 22 montre les métabolites possibles obtenus pour les *Lavandula dentata* dans le test d'exposition à l'ibuprofène.

Comme dans le cas précédent, aucun métabolite n'a été détecté dans les tiges et les feuilles après la première coupe ainsi que dans les racines des plantes après les tests d'exposition. Le plus grand nombre de métabolites a été détecté dans les feuilles des plantes et dans les coupes 2 et 4, et dans ces dernières seulement dans les feuilles des plantes exposées à des concentrations intermédiaires d'ibuprofène et seulement dans la tige de celles exposées à des concentrations élevées et faibles de la matière active, ce qui équivaut à 30 jours de test que 15 jours de test comme lors de cas précédents.

Le métabolite IBU-L 9, issu de l'acétylation, est le plus abondant, se trouvant à la fois dans la feuille et dans la tige des plantes exposées à des concentrations intermédiaires et faibles, atteignant plus de 3500 u.a.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la description des mécanismes impliqués dans la formation des différents métabolites détectés peut être trouvée dans les tableaux correspondants de l'annexe I.

Tableau 22. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Lavandula dentata* soumises à des tests d'exposition avec l'ibuprofène.
(En vert les échantillons de feuilles et les échantillons de tiges en marron).

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1			IBU-L-2	918			IBU-L-6	18482		
								IBU-L-7	3018		
	P1										
	P2	*									
	P2	*									
700 µg/L		*		IBU-L-4	6330			IBU-L-2	2267		
		*		IBU-L-5	38734			IBU-L-9	3002		
	P3	*		IBU-L-8	3843						
		*		IBU-L-9	3216						
		*		IBU-L-4	5925			IBU-L-2	1910		
	P3	*		IBU-L-5	38029			IBU-L-8	2055		
		*		IBU-L-8	3563			IBU-L-9	2948		
		*		IBU-L-9	2890						
	P4	*		IBU-L-9	1943	IBU-L-9	1419	IBU-L-1	164		
		*		IBU-L-3	26854			IBU-L-2	1866		
		*						IBU-L-9	2028		
		*		IBU-L-9	1716	IBU-L-9	1203	IBU-L-2	1719		
	P4	*						IBU-L-6	3195		
		*						IBU-L-9	1880		
10 µg/L	P5	*		IBU-L-8	4549	IBU-L-9	659				
		*		IBU-L-9	3629						
	P5	*									
		*						IBU-L-5	1765		
		*						IBU-L-6	18098		
	P6	*						IBU-L-7	1365		
		*						IBU-L-9	659		
		*						IBU-L-6	13462		
	P6	*						IBU-L-7	2115		
		*									

* Données non acquises en raison de problèmes instrumentaux.

4.7. CARBAMAZÉPINE DANS *JUNCUS SP.*

Le tableau 23 énumère les métabolites possibles de la carbamazépine détectés dans les échantillons analysés de *Juncus sp.* pendant l'essai d'exposition. Comme on peut le constater, en général, on observe que le nombre de métabolites est beaucoup plus élevé dans les échantillons prélevés lors de la deuxième coupe, diminuant légèrement lors de la troisième coupe, pour augmenter à nouveau à la fin du dosage. Ce fait pourrait être lié à l'état de la plante au cours de la troisième semaine de l'essai puisque, comme nous l'avons mentionné précédemment, la plante a commencé à montrer une détérioration appréciable, qui s'est stabilisée jusqu'à la quatrième semaine de l'essai. Comme on pouvait s'y attendre, chez les plantes exposées à des concentrations plus

faibles de dissolution de dopants, on a détecté plus de métabolites en maintenant la plante en meilleur état que chez celles exposées à des concentrations plus élevées, qui se sont aggravées plus rapidement pendant l'essai.

Le métabolite CBZ-J 36 apparaît avec des valeurs de zones importantes dans la quasi-totalité des échantillons de la troisième coupe de la plante, correspondant aux 21 jours d'essai, se déroulant la semaine suivante une diminution, qui suggère l'apparition de nouveaux produits de dégradation tout au long de l'essai et qui pourrait être liée à une adaptation de la plante ou de changement métabolique produit du stress subi pendant l'exposition.

Cependant, les niveaux du métabolite CBZ-J 34, correspondant à une hydroxylation et dont la présence est appréciée dès les 15 jours d'exposition, correspondant à une hydroxylation, présentent une situation inverse. Un maximum de ce métabolite est produit dans la deuxième coupe pour diminuer dans la troisième et finalement augmenter dans la quatrième coupe. Cette voie métabolique est l'une des plus fréquentes chez toutes les plantes et à tous les niveaux, car elle est à l'origine d'une plus grande quantité de ce métabolite chez les plantes exposées à une concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. On peut conclure que la production de ce métabolite est proportionnelle à la concentration de carbamazépine dans la solution d'irrigation.

Les déméthylations peuvent être attribuées comme voies de production des métabolites CBZ-J 1, CBZ-J 2 et CBZ-J 3, tous ayant la même masse théorique mais avec des temps de rétention différents. Ils n'apparaissent que dans les plantes exposées à de fortes concentrations, dans les deuxième et quatrième coupes et dans la racine, ce qui pourrait indiquer que ces métabolites sont produits essentiellement à des concentrations élevées de carbamazépine et dans un état optimal de la plante; ils ne sont pas détectés à des concentrations dans la solution d'irrigation inférieures à $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La perte du groupe carbonyle et d'un atome d'azote conduit au métabolite CBZ-J 6, qui apparaît à des concentrations élevées de solution d'irrigation et dans toutes les coupes, c'est le produit de dégradation avec les plus grandes surfaces détectées. La quantité de ce métabolite est également proportionnelle à la durée de l'essai, en augmentant progressivement la quantité à partir de la première semaine jusqu'à 30 jours, pour atteindre des valeurs de l'ordre de 40000 u.a.

Une tendance similaire a été confirmée avec les concentrations de carbamazépine détectées dans *Juncus sp.* (tableau 13) tout au long de l'essai d'exposition de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les plantes P1 et P2.

Tableau 23. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec la carbamazépine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CBZ-J 9	338	CBZ-J 3	3541/3365			CBZ-J 1	679/526	CBZ-J 11	721
				CBZ-J 2	1467/1948			CBZ-J 4	12787/14204		
				CBZ-J 6	12248			CBZ-J 6	35008/37514		
				CBZ-J 11	288/347			CBZ-J 29	1160		
				CBZ-J 13	2328/2047			CBZ-J 33	239		
				CBZ-J 25	580/572			CBZ-J 34	1787/1665		
				CBZ-J 29	1155/1286			CBZ-J 36	110		
				CBZ-J 30	1305/1262						
				CBZ-J 34	7348/5527						
	P2	CBZ-J 17	91	CBZ-J 1	9162/8806	CBZ-J 36	476/425	CBZ-J 1	552	CBZ-J 3	1414
		CBZ-J 30	70	CBZ-J 2	1441/1775	CBZ-J 34	953/895	CBZ-J 5	7066	CBZ-J 4	5236
				CBZ-J 6	17807			CBZ-J 6	40068	CBZ-J 11	243/547
				CBZ-J 11	348			CBZ-J 12	114	CBZ-J 12	68
				CBZ-J 13	4709/4842			CBZ-J 13	416	CBZ-J 16	103
				CBZ-J 20	219			CBZ-J 15	135	CBZ-J 20	340
				CBZ-J 29	3276			CBZ-J 34	2579/3266	CBZ-J 28	1014
				CBZ-J 34	3776/4740			CBZ-J 36	101	CBZ-J 29	12969/12241
				CBZ-J 35	13381/14176					CBZ-J 34	2677/2474
700 µg/L	P3	CBZ-J 18	228	CBZ-J 21	138	CBZ-J 8	94	CBZ-J 22	11726/12227	CBZ-J 11	127
		CBZ-J 33	781	CBZ-J 24	121	CBZ-J 36	645/643	CBZ-J 32	72	CBZ-J 27	2633
		CBZ-J 40	385/389	CBZ-J 28	116			CBZ-J 36	317	CBZ-J 31	296
		CBZ J 41	129	CBZ-J 29	733						
				CBZ-J 34	3411/3145						
				CBZ-J 35	299						
	P4	CBZ-J 4	127	CBZ-J 3	853/967	CBZ-J 36	495/719	CBZ-J 22	4676	CBZ-J 11	164/152
		CBZ-J 17	81	CBZ-J 29	823			CBZ-J 34	150	CBZ-J 13	164
		CBZ-J 18	86	CBZ-J 30	1009			CBZ-J 36	195	CBZ-J 32	148
		CBZ-J 35	131	CBZ-J 27	2145			CBZ-J 27	305	CBZ-J 34	783
		CBZ-J 37	126	CBZ-J 34	2764/2081						
		CBZ-J 40	254	CBZ-J 35	446/348						
		CBZ-J 41	553								
	P5	CBZ-J 37	113	CBZ-J 4	633	CBZ-J 8	119	CBZ-J 15	259	CBZ-J 7	86
				CBZ-J 5	665	CBZ-J 16	322	CBZ-J 16	110	CBZ-J 26	471
				CBZ-J 10	367	CBZ-J 36	585/592	CBZ-J 34	72	CBZ-J 32	741/787
				CBZ-J 19	295/296			CBZ-J 36	245		
				CBZ-J 35	263			CBZ-J 39	73		
				CBZ-J 38	1158						
	P6	CBZ-J 33	858/633	CBZ-J 4	493/548	CBZ-J 8	117	CBZ-J 16	141	CBZ-J 32	577/643
		CBZ-J 30	63	CBZ-J 19	116	CBZ-J 14	214	CBZ-J 36	237/242	CBZ-J 37	170
				CBZ-J 23	123	CBZ-J 15	420				
						CBZ-J 16	141				
						CBZ-J 32	550/104				
						CBZ-J 34	133				
						CBZ-J 36	514/654				
						CBZ-J 41	104				

4.8. FLUMÉQUINE DANS *JUNCUS SP.*

Le tableau 24 montre les métabolites de la fluméquine détectés dans des échantillons provenant du test d'exposition à la fluméquine sur *Juncus sp.* Comme dans le cas de la carbamazépine, un plus grand nombre de métabolites possibles a été détecté dans la deuxième coupe pour les concentrations d'expositions moyennes et élevées, et un grand nombre de métabolites n'ont pas été observés dans les échantillons de l'essai à faible concentration, qui semble être lié au statut de la plante pendant l'essai. Il convient également de noter le nombre élevé de métabolites détectés dans la racine après la fin de l'essai.

Le métabolite FMQ-21 apparaît de façon répétée et avec des valeurs surfaciques significatives dans pratiquement tous les échantillons analysés lors de la deuxième coupe, après 15 jours de dosage à des concentrations d'exposition moyennes et élevées. La route métabolique à l'origine de ce composé correspond à l'hydroxylation et à la perte subséquente d'un atome de fluor.

Dans les échantillons de la troisième coupe, après 21 jours d'exposition, FMQ-J 15 apparaît avec des valeurs de surface très élevées, presque exclusivement, et cela correspond à la voie qui implique une réduction du composé original plus la perte d'un atome de fluor. Avec un chemin de dégradation très similaire, FMQ-J 18 apparaît de façon répétée dans les coupes 2, 4 et à la racine. Cette voie métabolique génère donc les métabolites ayant les plus grandes surfaces, on peut donc dire qu'elle est tout à fait probable bien qu'elle ne soit pas liée à la concentration de fluméquine dans l'eau d'irrigation.

FMQ-J 14 est le produit de la perte d'un atome de fluor, avec la somme d'un atome d'hydrogène, n'est produit que dans des plantes exposées à de faibles concentrations de fluméquine.

Comme pour l'analyse de la carbamazépine dans la section précédente, la première coupe, effectuée après 7 jours d'exposition, montre moins de métabolites, qui ont des valeurs de surface relativement faibles et disparaissent dans le reste des échantillons à mesure que le temps d'exposition augmente.

Tableau 24. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec la fluméquine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Metab.	Zone	Metab.	Zone	Metab.	Zone	Metab.	Zone	Metab.	Zone
10 mg/L	P1	FMQ-J 24	90	FMQ-J 6	580			FMQ-J 16	121	FMQ-J 3	339
				FMQ-J 10	325			FMQ-J 18	113/121	FMQ-J 29	1193/913
				FMQ-J 18	103			FMQ-J 29	2387/2722	FMQ-J 36	3901
				FMQ-J 21	3197						
				FMQ-J 22	353						
				FMQ-J 25	15665						
	P2	FMQ-J 17	80	FMQ-J 9	64	FMQ-J 27	304/242	FMQ-J 18	123		
		FMQ-J 24	56	FMQ-J 19	6325/5757			FMQ-J 22	634		
		FMQ-J 30	4817	FMQ-J 21	3651			FMQ-J 28	340		
				FMQ-J 22	967			FMQ-J 29	3161/3734		
700 µg/L	P3	FMQ-J 4	100	FMQ-J 1	2584	FMQ-J 15	80047/37582	FMQ-J 15	33228/34256		
		FMQ-J 17	87	FMQ-J 9	87						
		FMQ-J 37	577	FMQ-J 19	4994						
		FMQ-J 39	123	FMQ-J 20	19764						
				FMQ-J 34	1155						
	P4			FMQ-J 21	5520/5497	FMQ-J 15	37121/73699	FMQ-J 2	91/80	FMQ-J 18	266
				FMQ-J 32	2628/954			FMQ-J 14	159	FMQ-J 26	308
				FMQ-J 34	446			FMQ-J 38	250	FMQ-J 31	91
				FMQ-J 35	997					FMQ-J 36	693
10 µg/L	P5	FMQ-J 14	308/306	FMQ-J 9	261	FMQ-J 16	238	FMQ-J 16	209/206	FMQ-J 9	305/267
		FMQ-J 19	135	FMQ-J 14	105	FMQ-J 27	348			FMQ-J 13	163
	P6	FMQ-J 6	363	FMQ-J 23	1424	FMQ-J 15	42054			FMQ-J 8	125
		FMQ-J 11	131	FMQ-J 30	875	FMQ-J 14	248			FMQ-J 14	372
		FMQ-J 14	293	FMQ-J 21	3269					FMQ-J 28	4346
		FMQ-J 37	338							FMQ-J 31	220
										FMQ-J 34	80/120
										FMQ-J 36	1478

4.9. CIPROFLOXACINE DANS *JUNCUS SP.*

Les métabolites possibles de la ciprofloxacine détectés dans des échantillons de *Juncus sp.* soumis à une exposition sont indiqués au tableau 25. Il est nécessaire de souligner le nombre élevé de métabolites qui apparaissent dans la première coupe, après 7 jours d'exposition, en comparaison avec CBZ et FMQ qui diminuent progressivement dans la deuxième coupe et significativement, comme c'est arrivé avec d'autres médicaments, dans la troisième coupe probablement en raison de l'état général de la plante, très mauvais à la troisième semaine d'exposition. Cependant, dans la quatrième coupe, après 30 jours d'exposition, il y a une augmentation significative du nombre de métabolites dans toutes les plantes et des concentrations de la solution d'irrigation.

Les métabolites attribuables aux détilations avec perte de $-C_2H_3N$, codes CPR-J 7 et CPR-J 8, ayant tous deux la même formule et la même masse théorique mais avec des temps de rétention différents, ce qui suppose la même voie de dégradation mais des structures différentes, sont ceux qui présentent les zones les plus importantes dans les chromatogrammes correspondants. Non obtenante, elle disparaît dans la plupart des échantillons lors de la troisième coupe et disparaît complètement lors de la quatrième coupe, probablement en raison de son manque de formation dans les plantes peu actives et de la perte de la génération précédente. Dans les plantes soumises à des concentrations plus élevées, il semble que même si l'état de la plante était très insatisfaisant, il n'en demeure pas moins qu'elle faisait partie de celles produites tout au long de l'essai.

Le métabolite CPR-J 16, qui correspond à une double hydroxylation avec perte du fragment $-C_4H_8N_2$, apparaît exclusivement dans la seconde coupe, dans toutes les plantes et à toutes les concentrations. Il s'ensuit que la formation de ce produit de dégradation dépend davantage de l'état de la plante et de l'accumulation de ciprofloxacine que de la concentration végétale. Après 15 jours d'essais, toutes les plantes étaient encore dans un état optimal.

Les hydroxyméthylations avec perte d'un atome d'oxygène, avec les mêmes masses théoriques de 285.1277 et formule moléculaire mais des temps de rétention différents, génèrent les métabolites possibles CPR-J 17, CPR-J 18 et CPR-J 19. Ils sont détectés à toutes les concentrations et dans toutes les plantes, tant dans la tige que dans les racines, étant plus abondants dans la deuxième coupe de la tige du *Juncus* sp.

D'autre part, la perte d'un hydroxyméthylène pour produire le métabolite CPR-J 31 semble être une voie importante de métabolisation de la ciprofloxacine puisque la surface du pic correspondant à ce métabolite augmente avec le temps dans l'essai d'exposition. Ce métabolite apparaît également dans certains échantillons de racines.

Les doubles hydroxylations avec perte du fragment $-C_2H_3N$, conduisent aux métabolites CPR-J 48, CPR-J 49 et CPR-J 50, avec des temps de rétention de 1.56 et 11.53 minutes. Ces produits sont abondants dans les plantes soumises à de faibles concentrations, se trouvant principalement dans la première semaine d'essai. Sa formation semble être liée à l'équilibre entre l'état de la plante, peu affecté en faibles concentrations, et la concentration de ciprofloxacine; l'excès d'exposition aux principes actifs ne semble pas favoriser l'obtention de ce métabolite, modifiant la réponse de la plante, faisant apparaître de nouveaux produits de dégradation et métabolisme.

Tableau 25. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec la ciproflaxacine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CPR-J 7	1052/1229	CPR-J 8	18755/12785	CPR-J 33	17852	CPR-J 19	195	CPR-J 11	5661
		CPR-J 14	873	CPR-J 16	635/692	CPR-J 8	3205/2967	CPR-J 27	115	CPR-J 19	189
		CPR-J 21	700	CPR-J 18	5278			CPR-J 33	4819/4225	CPR-J 27	188
		CPR-J 28	1173/1220	CPR-J 33	1348			CPR-J 74	112/111	CPR-J 35	177/288
		CPR-J 32	76/81	CPR-J 37	5375			CPR-J 83	205/199	CPR-J 40	253
		CPR-J 34	2266/2083	CPR-J 50	2487/3495					CPR-J 63	723/566
		CPR-J 38	150	CPR-J 54	462					CPR-J 82	575
		CPR-J 47	110/70	CPR-J 73	300					CPR-J 83	872
		CPR-J 60	438	CPR-J 80	202						
		CPR-J 84	186/213								
	P2	CPR-J 7	2498/2875	CPR-J 8	32032/41864	CPR-J 9	261	CPR-J 19	131/132	CPR-J 19	442
		CPR-J 14	1852/1499	CPR-J 16	735/692	CPR-J 33	1506/2021	CPR-J 33	12866	CPR-J 28	112
		CPR-J 21	592	CPR-J 18	5135/3744			CPR-J 35	79/78	CPR-J 29	136
		CPR-J 41	382	CPR-J 46	776	CPR-J 67	921	CPR-J 43	188	CPR-J 45	108
		CPR-J 53	597	CPR-J 48	3695	CPR-J 8	3658/3408	CPR-J 49	76/75	CPR-J 63	1532/1419
		CPR-J 56	181	CPR-J 50	4805	CPR-J 46	192	CPR-J 60	95/94	CPR-J 79	175/164
				CPR-J 59	1997			CPR-J 63	253	CPR-J 82	1266/1150
				CPR-J 75	362			CPR-J 68	172	CPR-J 83	1063/1229
								CPR-J 83	406/488		
700 µg/L	P3	CPR-J 1	100	CPR-J 16	892/753	CPR-J 6	310	CPR-J 12	869	CPR-J 31	1333
		CPR-J 15	258	CPR-J 19	623/822	CPR-J 33	4396/5892	CPR-J 43	118	CPR-J 33	1759
		CPR-J 19	836/1002	CPR-J 33	809	CPR-J 70	192	CPR-J 48	1150	CPR-J 39	5150/327
		CPR-J 21	625/597					CPR-J 51	137/129	CPR-J 68	370
		CPR-J 23	154					CPR-J 67	1154/948	CPR-J 78	150
		CPR-J 35	172/178								
		CPR-J 38	153								
		CPR-J 44	262								
		CPR-J 47	126								
		CPR-J 54	226								
		CPR-J 60	832/778								
	P4	CPR-J 62	74								
		CPR-J 76	1481/1599								
		CPR-J 3	172	CPR-J 5	2717/3302	CPR-J 80	204	CPR-J 10	60	CPR-J 18	112
		CPR-J 4	125/126	CPR-J 8	3201			CPR-J 13	243/314		
		CPR-J 32	100	CPR-J 16	1263/1181			CPR-J 22	221	CPR-J 53	176
		CPR-J 35	286	CPR-J 18	4797			CPR-J 33	8256	CPR-J 67	408
		CPR-J 36	295	CPR-J 46	504			CPR-J 67	248		
		CPR-J 49	149	CPR-J 66	1100/741						
		CPR-J 53	2285								
		CPR-J 58	389/428								
		CPR-J 74	477								
		CPR-J 80	90								
10 µg/L	P5	CPR-J 83	186								
		CPR-J 14	1742	CPR-J 8	1672	CPR-J 9	91	CPR-J 13	118	CPR-J 17	136
		CPR-J 15	129	CPR-J 16	1121/772	CPR-J 18	329	CPR-J 25	118	CPR-J 51	95
		CPR-J 33	694	CPR-J 45	1232	CPR-J 48	318	CPR-J 33	10960	CPR-J 77	99/137
		CPR-J 35	96			CPR-J 52	134	CPR-J 45	158	CPR-J 80	84
		CPR-J 37	566/458			CPR-J 53	130	CPR-J 48	382		
		CPR-J 38	241	CPR-J 54	322	CPR-J 70	381	CPR-J 52	94		
		CPR-J 44	218	CPR-J 59	395	CPR-J 73	70	CPR-J 55	155		
		CPR-J 53	1718	CPR-J 66	1544			CPR-J 57	102		
	P6	CPR-J 54	268	CPR-J 71	265			CPR-J 70	130		
		CPR-J 64	85	CPR-J 78	1770			CPR-J 74	103		
		CPR-J 3	130	CPR-J 16	1024/953	CPR-J 48	1145	CPR-J 2	216	CPR-J 6	103
		CPR-J 26	250	CPR-J 19	196	CPR-J 54	68	CPR-J 59	93	CPR-J 18	117
		CPR-J 47	64	CPR-J 78	1404	CPR-J 56	357	CPR-J 12	622		
		CPR-J 54	481			CPR-J 65	110			CPR-J 30	120
		CPR-J 69	77			CPR-J 67	1009			CPR-J 31	120
						CPR-J 72	8.81			CPR-J 34	132
										CPR-J 39	689
										CPR-J 41	94
										CPR-J 64	726
										CPR-J 73	149

4.10. ENROFLOXACINE DANS *JUNCUS SP.*

La quantité de métabolites de l'enrofloxacin dans les *Juncus sp.* soumis au test d'exposition (tableau 26) est à nouveau considérable dans la première et la deuxième coupe et diminue de manière significative, comme dans les cas précédents avec d'autres principes actifs, dans la troisième coupe de la tige de la plante, correspondant aux 21 jours du test d'exposition, probablement en raison du très mauvais état de la plante la troisième semaine. Bien qu'apparemment le nombre de métabolites semble augmenter de manière significative dans la quatrième coupe, les zones des pics analysés sont très faibles, ce qui est donc vraiment compatible avec un mauvais état de la plante à ce stade de l'essai.

La voie métabolique de la déméthylation avec perte du groupe $-C_4H_7N$ (ENR-J 16) prédomine dans la première coupe de la tige de la plante, atteignant de fortes accumulations tant dans l'échantillon que dans sa réplique. Le métabolite ENR-J 13 issu d'une désétilation avec perte du groupe $-C_4H_7N$, apparaît avec des valeurs de surface importantes dans les échantillons de racines dopés à de fortes concentrations de dissolution de différents principes actifs.

D'autre part, on observe l'abondance dans la racine des plantes soumises à des concentrations élevées du métabolite ENR-J 75 correspondant à une acétylation avec perte du groupe $-C_2H_4$, qui se retrouve également dans les échantillons de tiges de la quatrième coupe exposée à des concentrations élevées P2, ainsi que dans plusieurs tiges de *Juncus sp.* de la première semaine d'essai, tant en concentrations élevées, intermédiaires et faibles de dissolution dopante.

Au cours de la troisième semaine d'essai, la formation du métabolite ENR-J 29 à partir d'une détilation avec perte d'un atome d'oxygène prédomine, provenant également des échantillons de tiges de la première semaine, ainsi que des échantillons de racines des plantes.

Le métabolite ENR-J 74 provenant de la perte d'un atome d'oxygène et de la formation subséquente de l'adduit de sodium a été trouvé dans les échantillons de tiges analysés 15 jours après le test d'exposition. Celle-ci s'est formée dans la racine des plantes soumises à des concentrations élevées et intermédiaires de solution dopante P2 et P4, car des résidus apparaissent dans la racine en faibles quantités. Leur présence disparaît au fur et à mesure que le temps d'exposition augmente.

L'ENR-J 77 provenant de l'hydroxylation apparaît dans des échantillons de tiges exposés à des concentrations de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $700 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ analysées 15 jours après l'essai d'exposition, montrant des valeurs de surface relativement élevées, diminuant dans les semaines suivantes dans les échantillons P2 et P3 et disparaissant dans le reste.

À de faibles concentrations, ce métabolite apparaît dans la racine, ce qui pourrait expliquer son absence dans la tige à cette concentration.

Tableau 26. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec l'enrofloxaciné.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Metab.	Zone	Metab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	ENR-J 8	162	ENR-J 16	31158			ENR-J 30	97	ENR-J 1	1624
		ENR-J 13	1229/1052	ENR-J 18	412			ENR-J 48	136	ENR-J 13	40982
		ENR-J 21	12791/11861	ENR-J 44	183					ENR-J 44	147
		ENR-J 29	111	ENR-J 74	689					ENR-J 48	370
		ENR-J 51	1528/1641	ENR-J 78	184					ENR-J 66	120
		ENR-J 60	134							ENR-J 74	85/92
	P2									ENR-J 75	873/780
										ENR-J 81	139
		ENR-J 12	526	ENR-J 10	263	ENR-J 4	311	ENR-J 42	95	ENR-J 13	48477/50395
		ENR-J 13	2498/2876	ENR-J 23	633	ENR-J 19	1506/2022	ENR-J 48	90	ENR-J 29	1803
		ENR-J 16	9377/9039	ENR-J 31	211	ENR-J 49	90	ENR-J 61	92	ENR-J 40	179
		ENR-J 25	2616	ENR-J 55	537/470	ENR-J 77	995	ENR-J 75	488	ENR-J 48	227
		ENR-J 41	682/750	ENR-J 49	445					ENR-J 52	90
		ENR-J 42	585/467	ENR-J 61	316					ENR-J 63	92
		ENR-J 59	930	ENR-J 74	1691					ENR-J 66	85
		ENR-J 61	386	ENR-J 77	13557/10691					ENR-J 74	90
		ENR-J 62	718							ENR-J 75	1266/1229
		ENR-J 75	277								
700 µg/L	P3	ENR-J 7	113	ENR-J 18	1018	ENR-J 19	4396	ENR-J 21	156	ENR-J 1	285
		ENR-J 16	14771/15661	ENR-J 34	289			ENR-J 33	200	ENR-J 26	207
		ENR-J 18	366/326	ENR-J 44	164			ENR-J 39	95	ENR-J 32	731
		ENR-J 22	153	ENR-J 66	750			ENR-J 70	92	ENR-J 49	102
		ENR-J 29	126	ENR-J 74	1080/843			ENR-J 77	233	ENR-J 52	164
		ENR-J 32	489	ENR-J 77	3985/3230					ENR-J 63	515
		ENR-J 33	94							ENR-J 80	5239
		ENR-J 40	273								
		ENR-J 50	91								
		ENR-J 61	607/583								
	P4	ENR-J 69	97								
		ENR-J 70	329								
		ENR-J 78	318								
		ENR-J 10	127	ENR-J 19	872	ENR-J 29	1539/1647	ENR-J 15	315/244	ENR-J 4	208
		ENR-J 11	950	ENR-J 36	5932			ENR-J 21	98	ENR-J 27	95
		ENR-J 16	11848/10704	ENR-J 43	740			ENR-J 27	92	ENR-J 35	78
		ENR-J 17	704	ENR-J 61	583			ENR-J 35	94	ENR-J 45	101
		ENR-J 18	237/256	ENR-J 74	434			ENR-J 38	171	ENR-J 52	1750
		ENR-J 32	363	ENR-J 77	4580			ENR-J 49	90	ENR-J 54	192
		ENR-J 41	712/680	ENR-J 78	201			ENR-J 52	98	ENR-J 56	516
10 µg/L	P5	ENR-J 47	246	ENR-J 83	357			ENR-J 66	98	ENR-J 73	285
		ENR-J 61	1438	ENR-J 81	509			ENR-J 78	94	ENR-J 74	92
		ENR-J 63	812							ENR-J 78	150
		ENR-J 70	116/183							ENR-J 79	80
		ENR-J 75	186/265							ENR-J 81	309
		ENR-J 76	351							ENR-J 84	98
		ENR-J 14	2079	ENR-J 13	813			ENR-J 4	98	ENR-J 1	142
		ENR-J 19	694/559	ENR-J 18	534			ENR-J 15	120	ENR-J 2	141
		ENR-J 27	218	ENR-J 23	995			ENR-J 57	99	ENR-J 4	162
		ENR-J 34	269	ENR-J 34	151			ENR-J 61	91	ENR-J 23	436
	P6	ENR-J 41	350	ENR-J 42	494			ENR-J 79	108	ENR-J 37	87
		ENR-J 42	118	ENR-J 54	1626					ENR-J 38	287
		ENR-J 46	95	ENR-J 55	738					ENR-J 49	122
		ENR-J 58	98	ENR-J 57	745					ENR-J 53	327
		ENR-J 75	862	ENR-J 61	533/744					ENR-J 67	116
		ENR-J 82	1746	ENR-J 63	708					ENR-J 71	111
				ENR-J 68	335/450						
				ENR-J 74	735						
				ENR-J 81	445						
				ENR-J 83	605						
	P6	ENR-J 8	150	ENR-J 44	1307	ENR-J 2	250	ENR-J 2	176	ENR-J 3	285
		ENR-J 9	130			ENR-J 29	1385	ENR-J 18	95	ENR-J 4	392
		ENR-J 16	8510/7526			ENR-J 35	423	ENR-J 20	193	ENR-J 5	112
		ENR-J 21	2029/2016					ENR-J 28	82	ENR-J 21	132
		ENR-J 24	277					ENR-J 42	97	ENR-J 26	337
		ENR-J 27	235					ENR-J 48	157	ENR-J 28	256
		ENR-J 34	482					ENR-J 49	90	ENR-J 30	400
		ENR-J 51	594					ENR-J 61	108/93	ENR-J 32	127
		ENR-J 61	369/202					ENR-J 79	278	ENR-J 35	102
		ENR-J 70	220					ENR-J 80	162	ENR-J 45	117
		ENR-J 71	397							ENR-J 49	394/452
										ENR-J 65	99
										ENR-J 70	100/210
										ENR-J 72	90
										ENR-J 76	277
										ENR-J 77	1837/928

4.11. DICLOFÉNAC DANS *JUNCUS SP.*

Les possibles métabolites obtenus dans les plantes de *Juncus sp.* exposées au test d'exposition sont montrées dans le tableau 27, on observe à simple vue une plus grande quantité de métabolites dans la tige des plantes irriguées à de faibles concentrations de dissolution du dopant. Cependant, la situation est inversée à la racine, puisqu'à la fin de l'essai, c'est dans les plantes irriguées avec une dissolution à plus forte concentration qu'un plus grand nombre de métabolites est identifié. Il est significatif qu'aucun métabolite possible n'a été détecté dans la première coupe des plantes irriguées avec une solution de diclofénac à haute concentration, ainsi qu'un seul composé dans la troisième coupe de ces mêmes plantes.

Le métabolite de la molécule mère, avec une perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$ (DCL-J 7) est identifié dans la première coupe de la tige à des concentrations intermédiaires et faibles, dans la deuxième coupe de la tige, à des concentrations intermédiaires (P4) dans la troisième coupe à toutes concentrations, et dans la racine des plantes irriguées avec dissolution de la forte concentration en diclofénac.

Dans la deuxième coupe de la tige de la plante, les métabolites DCL-J 19 et DCL-J 25 se retrouvent à toutes les concentrations, tant dans l'échantillon que dans sa réplique, cette dernière apparaît également dans la première coupe de l'une des plantes irriguées à faible concentration. Ces métabolites correspondent au composé de sodium correspondant après la perte du fragment $-C_6H_2Cl_2$ et une double hydroxylation avec perte d'un fragment $-C_6H_2Cl_2$, respectivement. Les pics chromatographiques correspondant à DCL-J 25 atteignent des zones de plus de 16000 u.a.

La voie métabolique de l'acétylation avec perte du fragment $-C_6H_2Cl_2$ est le métabolite DCL-J 26, avec une masse théorique de 193.0739 m/z et un temps de rétention de 3.27 minutes. Ce métabolite a été identifié dans des plantes irriguées avec des solutions de faible et moyenne concentration dans la troisième coupe de la tige et, à toutes les concentrations, dans la dernière coupe du test. Le métabolite DCL-J 30, correspondant à une distillation avec perte d'un atome de chlore et addition d'un atome d'hydrogène, a été identifié dans la première coupe de plantes irriguées avec des solutions à faible et moyenne concentration, ainsi que dans la racine de la plante P6, irriguée avec solution à faible concentration.

D'autre part, un métabolite possible (DCL-J 45) est identifié, avec un temps de rétention de 11.07 minutes, provenant d'une hydroxylation formée à partir de 21 jours d'essai dans des plantes irriguées à des concentrations intermédiaires. Ce même métabolite possible a été détecté dans la dernière coupe et dans la racine des plantes irriguées avec des solutions à haute et moyenne concentration. Il est significatif de la présence du métabolite DCL-J 42 possible dans la racine des

plantes après le test d'exposition. Ce composé provient d'une déméthylation, et atteint des pics chromatographiques avec une surface allant jusqu'à 42000 u.a. dans des plantes irriguées à forte concentration dissolution. Il a également été identifié, bien qu'en plus petite quantité, dans des tiges de la dernière coupe de plantes irriguées avec une forte concentration de diclofénac.

Tableau 27. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec le diclofénac.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1			DCL-J 2	2456			DCL-J 32	94	DCL-J 1	975/699
				DCL-J 19	8202			DCL-J 36	57	DCL-J 7	435/549
				DCL-J 25	7621			DCL-J 42	461/437	DCL-J 14	1258/722
				DCL-J 8	6723/5983			DCL-J 45	2899/2789	DCL-J 16	1312/975
				DCL-J 15	149					DCL-J 38	62495
				DCL-J 29	231/168					DCL-J 42	860
				DCL-J 44	117					DCL-J 45	3298/1751
	P2			DCL-J 2	2209/2101	DCL-J 7	66	DCL-J 1	1512/1525	DCL-J 1	1090/964
				DCL-J 8	5207			DCL-J 12	415/393	DCL-J 2	1557/1612
				DCL-J 19	2555			DCL-J 26	943	DCL-J 3	1049
				DCL-J 16	1077/1035			DCL-J 45	8677/8499	DCL-J 4	261
				DCL-J 25	12167/10739					DCL-J 6	198
				DCL-J 28	1298					DCL-J 14	1131/1206
				DCL-J 29	361/304					DCL-J 16	1611/1596
				DCL-J 34	242/284					DCL-J 17	164
				DCL-J 45	10580					DCL-J 31	339
										DCL-J 39	86
										DCL-J 42	4200/3979
										DCL-J 45	5534
700 µg/L	P3	DCL-J 30	114	DCL-J 2	3260/3449	DCL-J 41	100/101	DCL-J 10	181	DCL-J 1	616/353
		DCL-J 37	60/40	DCL-J 19	1884/1519	DCL-J 45	95	DCL-J 12	1535/1709	DCL-J 16	934/634
				DCL-J 25	16733/16467	DCL-J 6	61/66	DCL-J 26	14621/14210	DCL-J 18	913
				DCL-J 28	1025/966	DCL-J 7	174/153	DCL-J 28	117	DCL-J 42	284/397
						DCL-J 27	1347	DCL-J 45	239	DCL-J 15	151
										DCL-J 4	97
										DCL-J 45	5029
	P4									DCL-J 14	207
		DCL-J 30	218	DCL-J 7	2642/2371	DCL-J 15	65/77	DCL-J 9	173/1026	DCL-J 4	242/382
		DCL-J 7	2643/2371	DCL-J 19	1979/5521	DCL-J 17	1248	DCL-J 26	768/1837	DCL-J 5	779/754
		DCL-J 21	812	DCL-J 25	4639/14793	DCL-J 26	4404	DCL-J 39	57	DCL-J 15	177/187
		DCL-J 22	1979/1884	DCL-J 8	10938	DCL-J 40	155	DCL-J 45	326/259	DCL-J 42	391/406
		DCL-J 23	286	DCL-J 12	4662	DCL-J 45	110				
		DCL-J 38	207	DCL-J 20	13061	DCL-J 7	241/199				
				DCL-J 28	1079	DCL-J 13	36				
				DCL-J 35	3239	DCL-J 22	76/60				
10 µg/L	P5	DCL-J 30	179	DCL-J 5	3158/3030	DCL-J 15	83	DCL-J 9	864/951	DCL-J 15	112/114
		DCL-J 39	127	DCL-J 19	9133/9084	DCL-J 16	1102/878	DCL-J 12	733/647	DCL-J 5	1096/1662
		DCL-J 7	2779/2674	DCL-J 25	13574/14387	DCL-J 26	416	DCL-J 16	222		
		DCL-J 23	280/264	DCL-J 7	5174/4978	DCL-J 33	56	DCL-J 26	1160/1098		
		DCL-J 46	145	DCL-J 8	7496/7500	DCL-J 7	175/303	DCL-J 33	50		
		DCL-J 25	13573	DCL-J 34	187/167	DCL-J 19	87				
		DCL-J 20	9084	DCL-J 35	5035/4191						
	P6			DCL-J 43	1716						
		DCL-J 30	193	DCL-J 34	342/319	DCL-J 15	72	DCL-J 12	1080/1116	DCL-J 15	248/206
		DCL-J 7	2355/2682	DCL-J 35	4089	DCL-J 26	960	DCL-J 26	1097/973	DCL-J 4	220
		DCL-J 22	1512	DCL-J 43	2092	DCL-J 39	116/92	DCL-J 39	104/69	DCL-J 5	988
		DCL-J 23	272			DCL-J 7	238/184	DCL-J 17	50	DCL-J 30	128
								DCL-J 11	30	DCL-J 23	1175

4.12. IBUPROFÈNE DANS *JUNCUS SP.*

Dans le tableau 28, les métabolites possibles obtenus à partir de l'essai d'exposition de *Juncus sp.* avec l'ingrédient actif ibuprofène sont énumérés, visuellement, l'absence de métabolites est observée par rapport aux autres ingrédients actifs dans la même plante, ceci est dû au fait que la plupart des métabolites acquis sont soit dans le contrôle ou dans la cible des échantillons, tant dans la matrice de la tige de la plante que dans la racine.

Dans le métabolite IBU-J 4, issu d'une hydroxylation, il est généré à la fois dans la racine et dans la tige, bien que la voie métabolique qui implique la perte d'un hydroxyméthylène, formant le métabolite IBU-J 1, soit la plus abandonnante dans la tige du *Juncus sp.* le trouvant dans l'échantillon et dans sa réplique avec des unités de surface du même ordre de grandeur.

Tableau 28. Possibles métabolites trouvés dans les plantes *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition avec l'ibuprofène.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Coupe 4		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1			IBU-J 1	817/775					IBU-J 4	61/75
										IBU-J 2	22
	P2			IBU-J 1	2013/2166					IBU-J 2	144/157
				IBU-J 4	3737					IBU-J 4	87/89
700 µg/L	P3			IBU-J 1	543						
				IBU-J 3	1411/1343						
	P4										
10 µg/L	P5										
	P6										

4.13. CARBAMAZÉPINE DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Le tableau suivant énumère les métabolites possibles de la carbamazépine formés dans *Salicornia eu.* lorsqu'ils sont soumis à des essais d'exposition. La racine de la plante, analysée à la fin de l'essai, peut être considérée comme la partie où le plus grand nombre de métabolites a été obtenu, et elle est également plus abondante dans les plantes exposées à de faibles concentrations (P5 et P6) que dans les plantes soumises à des concentrations élevées.

Dans les tiges des plantes exposées à de fortes concentrations, pratiquement aucun produit secondaire n'a été détecté et des métabolites ont été trouvés dans les plantes soumises à une solution d'irrigation de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Probablement, les concentrations élevées, qui ont favorisé l'aggravation des plantes, sont responsables du manque de métabolites, et la perte d'activité biologique est directement liée à l'absence de métabolites.

Lorsque la concentration des solutions d'irrigation diminue, la quantité de métabolites augmente, atteignant son maximum dans la plante P4, puis diminue de nouveau à de faibles concentrations, peut-être en raison de l'absence de principe actif, puisqu'aucune accumulation de carbamazépine n'est observée chez les plantes P5 et P6 (tableau 29). Cependant, à mesure que les semaines d'essai augmentent, la quantité de métabolites augmente, atteignant leur nombre maximal dans la troisième coupe de l'essai.

Le fait que le métabolite CBZ-S 14 apparaisse dans tous les échantillons de racines, quelle que soit la concentration de la solution d'irrigation, semble indiquer que soit une partie de la carbamazépine fournie reste sous forme de résidu, subissant la voie métabolique consistant en une acétylation avec perte du groupe $-\text{HN}$, soit ce métabolite formé dans les racines n'est pas absorbé par la plante.

Le métabolite le plus abondant dans la première coupe de la tige est CBZ-S 11, atteignant des zones de 600 u.a. et correspondant à une voie métabolique d'hydratation avec perte d'un groupe $-\text{HN}$.

15 jours après l'essai, le métabolite CBZ-S 3, correspondant à la perte du fragment $-\text{CHNO}$, a été détecté dans les plantes P3 à P6, c'est-à-dire à des concentrations moyennes et faibles de carbamazépine, augmentant la quantité à mesure que la concentration de la solution d'irrigation diminue. Au cours de la dernière semaine, la voie métabolique du sodium avec perte du groupe CBZ-S 8 prédominait, ce qui correspond au même métabolite CBZ-S 3 que le produit d'addition du sodium, et qui apparaît dans deux des six plantes analysées, P3 et P5.

Aucune des voies métaboliques les plus fréquentes n'est continuellement maintenue dans les diverses coupes ou à la racine, à l'exception du métabolite CBZ-S 9, dont la formation semble diminuer avec l'augmentation du temps d'essai, de sorte que la formation de métabolites carbamazépine dans *Salicornia eu.* semble plus liée au statut des plantes que la concentration ou le temps de dilution pour l'irrigation.

Tableau 29. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec la carbamazépine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Raíz	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CBZ-S 11	98						
	P1	CBZ-S 11	90						
	P1								
	P2							CBZ-S 1	77
	P2							CBZ-S 6	98
								CBZ-S 12	153
	P2							CBZ-S 14	94
700 µg/L	P2							CBZ-S 7	76
	P3	CBZ-S 15	197	CBZ-S 3	141	CBZ-S 8	340	CBZ-S 14	70
	P3							CBZ-S 14	93
	P3								
	P4	CBZ-S 11	315	CBZ-S 3	176	CBZ-S 13	878	CBZ-S 13	330
	P4	CBZ-S 11	617	CBZ-S 9	337	CBZ-S 9	217	CBZ-S 13	347
10 µg/L	P4	CBZ-S 2	77	CBZ-S 3	757			CBZ-S 14	82
	P5	CBZ-S 9	911	CBZ-S 4	570	CBZ-S 8	656	CBZ-S 14	86
				CBZ-S 3	1051	CBZ-S 10	235		
	P5					CBZ-S 8	260		
	P5					CBZ-S 12	1073		
						CBZ-S 8	186		
	P6			CBZ-S 3	1776	CBZ-S 10	150	CBZ-S 13	127
	P6							CBZ-S 13	78
	P6							CBZ-S 3	75
								CBZ-S 5	60
								CBZ-S 14	100

4.14. FLUMÉQUINE DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Le tableau suivant montre les métabolites possibles détectés dans la tige et la racine de *Salicornia eu.* lors d'essais d'exposition avec des solutions d'irrigation contenant de la fluméquine.

On observe comment, au fur et à mesure que le temps de l'essai évolue, la quantité de métabolites augmente, obtenant le nombre maximum à la fin de l'essai à 21 jours, comme on l'a aussi vu avec CBZ. Cela peut être lié soit à l'état général de la plante, soit à l'absorption de FMQ par la plante, il semble qu'au départ la plante absorbe le principe actif tel quel, sans que les concentrations de FMQ dans la plante produisent une réponse métabolique sur FMQ, jusqu'à un certain point dans le temps, les processus de métabolisation de la plante ont lieu. On pourrait également considérer que les différentes voies métaboliques sont relativement lentes, les différents métabolites apparaissant progressivement tout au long de l'essai. Cette situation est similaire à celle observée avec la carbamazépine comme substance active.

La voie métabolique avec perte d'un atome de fluor et addition d'un atome d'hydrogène conduit aux métabolites FMQ-S 5 et FMQ-S 6, avec des temps de rétention de 5.16 et 9.64 minutes, respectivement. Ils apparaissent à toutes les concentrations dans la troisième coupe de la tige de la plante, et dans une plus grande mesure FMQ-S 5 pour les concentrations les plus élevées. Chez les plantes exposées à $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, la quantité de FMQ-S 6 atteint 800 u.a.; cette voie métabolique est donc plus probable à des concentrations intermédiaires lorsque la plante est dans de meilleures conditions.

Contrairement aux métabolites obtenus à partir de la carbamazépine, les métabolites correspondants de la fluméquine apparaissent à peine dans la racine de la plante, ce qui semble indiquer un métabolisme radicalement différent pour les deux médicaments.

Tableau 30. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec la fluméquine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1					FMQ-S 3	102		
						FMQ-S 5	92		
	P1					FMQ-S 5	128		
	P1								
	P2					FMQ-S 1	73	FMQ-S 6	115
	P2								
	P2								
700 $\mu\text{g}/\text{L}$	P3					FMQ-S 6	184	FMQ-S 12	69
	P3								
	P3					FMQ-S 6	250		
						FMQ-S 8	217		
	P4			FMQ-S 2	88	FMQ-S 6	533		
						FMQ-S 13	732		
	P4			FMQ-S 9	85	FMQ-S 6	789		
						FMQ-S 7	342		
	P4			FMQ-S 8	751	FMQ-S 6	800		
				FMQ-S 10	62	FMQ-S 4	101		
						FMQ-S 15	233		
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	P5	FMQ-S 11	394	FMQ-S 13	845	FMQ-S 7	264		
	P5			FMQ-S 4	162	FMQ-S 13	554		
	P5								
	P6							FMQ-S 12	92
	P6							FMQ-S 12	111
	P6					FMQ-S 10	572		
						FMQ-S 13	501		
						FMQ-S 14	1273		

4.15. CIPROFLOXACINE DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Le tableau 31 montre les métabolites possibles obtenus à partir de la tige et de la racine des plantes de *Salicornia eu.* testées avec des solutions d'irrigation contenant de la ciprofloxacine. On observe que le métabolite CPR-S 30 est toujours formé dans la racine, indépendamment de la concentration dans la solution d'irrigation, produit d'une double hydroxylation avec perte du groupe C_2H_2 , de sorte que cette voie métabolique semble étroitement liée à la racine de la plante.

Dans les tiges des première et troisième coupes apparaît le métabolite CPR-S 29, correspondant à une voie métabolique du sodium avec perte d'un atome de fluor et addition d'un atome d'hydrogène, étant plus abondant dans les plantes P3 et P4 qui ont été irriguées à des concentrations de dissolution dopante de $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La voie métabolique "sodium avec perte d'un atome d'oxygène" conduit à la formation du métabolite CPR-S 31, qui est le plus fréquent à 15 jours d'exposition de la plante (deuxième coupe) apparaissant chez toutes les plantes sauf chez celles irriguées avec dissolution diluée ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Sa formation semble être liée à la concentration de la solution d'irrigation et au temps d'assimilation du médicament par la plante. Des quantités de métabolites du même ordre ont été détectées pour des concentrations élevées et intermédiaires, et seulement dans cette coupe.

Dans la première coupe de la tige, une semaine après l'essai, les métabolites sont plus prédominants chez les plantes exposées à des solutions contenant de faibles concentrations de ciprofloxacine. Le métabolite CPR-S 17, correspondant à une hydratation avec perte du groupe C_2H_3N , et qui n'apparaît que dans cette coupe, semble indiquer que cette voie métabolique ne se produit que dans les premiers stades de l'exposition.

Les plantes P3 et P4, exposées à des concentrations intermédiaires, présentaient la plus grande quantité de métabolites dans les tiges tout au long de l'essai et dans la racine. Il est probable que l'équilibre entre la concentration de la solution d'irrigation et l'état des plantes a conditionné le métabolisme global de la ciprofloxacine.

Tableau 31. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec la ciprofloxacine.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	CPR-S 6	83	CPR-S 31	298	CPR-S 1	489		
		CPR-S 31	172			CPR-S 29	290		
	P1	CPR-S 2	70	CPR-S 31	315	CPR-S 11	78		
		CPR-S 23	120						
	P1	CPR-S 5	155						
		CPR-S 7	75						
	P2	CPR-S 7	67			CPR-S 5	325	CPR-S 30	1965
						CPR-S 16	2797		
	P2	CPR-S 3	68	CPR-S 31	259	CPR-S 5	358		
		CPR-S 4	90			CPR-S 11	207		
		CPR-S 7	79			CPR-S 14	162		
						CPR-S 15	114		
	P2					CPR-S 16	3236		
						CPR-S 29	198		
	P2			CPR-S 31	289				
700 µg/L	P3	CPR-S 7	82	CPR-S 31	352	CPR-S 29	571	CPR-S 27	87
				CPR-S 22	70				
	P3					CPR-S 1	330	CPR-S 27	90
						CPR-S 29	327		
	P3							CPR-S 10	75
	P4	CPR-S 15	99	CPR-S 1	416	CPR-S 1	262	CPR-S 10	62
		CPR-S 21	249			CPR-S 5	128	CPR-S 30	1304
		CPR-S 29	150			CPR-S 20	170		
	P4	CPR-S 5	95	CPR-S 1	253	CPR-S 1	283	CPR-S 30	2213
		CPR-S 29	247	CPR-S 31	274	CPR-S 29	322		
	P4	CPR-S 6	96	CPR-S 1	237	CPR-S 14	385	CPR-S 10	70
		CPR-S 15	164	CPR-S 31	386	CPR-S 29	202	CPR-S 30	2959
		CPR-S 29	530						
10 µg/L	P5	CPR-S 8	366		7142	CPR-S 24	152	CPR-S 12	420
		CPR-S 9	330	CPR-S 20	734			CPR-S 30	1258
		CPR-S 5	6202	CPR-S 25	1088				
		CPR-S 17	335	CPR-S 17	613				
		CPR-S 19	4773	CPR-S 9	358				
		CPR-S 32	1763						
	P5	CPR-S 5	973	CPR-S 7	4582				
		CPR-S 17	249						
		CPR-S 32	2768						
	P5	CPR-S 16	958	CPR-S 7	3066			CPR-S 12	522
		CPR-S 17	247	CPR-S 28	793			CPR-S 30	1673
		CPR-S 26	2339	CPR-S 22	622				
		CPR-S 32	2058						
	P6							CPR-S 12	1556
								CPR-S 30	5937
	P6							CPR-S 12	1673
								CPR-S 30	6726
	P6							CPR-S 12	1831
								CPR-S 18	77
	P6							CPR-S 30	6781

4.16. ENROFLOXACINE DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Les métabolites possibles obtenus dans la tige et la racine des plantes de *Salicornia eu.* exposées à des dissolutions avec différentes concentrations d'enrofloxacin sont montrées dans le tableau 32. Il est observé que la quantité de métabolites augmente avec l'augmentation du temps du test d'exposition, obtenu dans la tige de la plante de la troisième coupe, correspondant aux 21 jours du test, une quantité de métabolites supérieure à celle du début de l'essai.

Dans toutes les matrices végétales, quelle que soit la concentration de l'ingrédient actif dans la solution dopante, le métabolite ENR-S 3 se forme, correspondant à une double hydroxylation avec perte du groupe $-C_{13}H_8NO_3F$.

Il est générée dans toutes les coupes de la tige de la *Salicornia eu.* indistinctement de la concentration de la dissolution, la voie métabolique de déshydratation des alcools avec perte du groupe $-C_4H_7N$, (ENR-J 6) étant plus abondante dans la troisième coupe de la tige.

Le métabolite ENR-J 28 issu d'une hydroxylation avec perte du groupe $-C_2H_4$ provient principalement de la première coupe de la tige pendant la première semaine du test d'exposition et de la deuxième coupe de la tige dans la plante P2, exposée à des concentrations élevées de dissolution dopante des analytes.

D'autre part, le métabolite ENR-S 27, de formule empirique $C_{19}H_{24}FN_3O_2$, n'est formé que dans la troisième coupe de la tige, en particulier dans les plantes irriguées avec de fortes concentrations de dissolution du dopant, ne se trouvant pas dans les plantes exposées à de faibles concentrations.

La matrice de la racine de *Salicornia eu.* est dominée par les métabolites des plantes P6 et P2, qui sont soumis à des concentrations de solution dopante de $10 \mu g \cdot L^{-1}$ et $10 mg \cdot L^{-1}$ respectivement, avec pratiquement aucun autre métabolite racinaire des plantes, puisque la plupart se trouvent soit dans la cible des échantillons soit dans les témoins.

Comme dans le cas des métabolites possibles trouvés dans les échantillons de *Salicornia eu.* exposés à des solutions de fluméquine, aucun métabolite n'est trouvé dans les matrices souches à des concentrations élevées de solutions dopantes (P1 et P2) et très peu se trouvent dans la racine de la plante, la plupart se trouvant dans la cible et dans les témoins, et sont donc rejetés comme métabolites venant des principes actifs.

Tableau 32. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec l'enrofloxacin.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1					ENR-S 27	704/651		
	P1					ENR-S 15	114		
	P1					ENR-S 27	177		
	P1					ENR-S 2	149		
	P2			ENR-S 1	654	ENR-S 6	358	ENR-S 3	235
				ENR-S 3	215	ENR-S 9	338	ENR-S 38	42
				ENR-S 34	198	ENR-S 10	207		
						ENR-S 13	3236		
	P2					ENR-S 27	312		
				ENR-S 28	702	ENR-S 6	325	ENR-S 26	33
						ENR-S 13	2798		
	P2					ENR-S 33	747		
700 µg/L	P3	ENR-S 5	2066	ENR-S 31	424	ENR-S 32	142	ENR-S 25	102
		ENR-S 28	572						
		ENR-S 31	476						
	P3								
	P3								
	P4	ENR-S 3	163	ENR-S 6	183	ENR-S 6	1184		
		ENR-S 12	164	ENR-S 3	246	ENR-S 14	405		
		ENR-S 29	78	ENR-S 14	153				
	P4	ENR-S 28	396	ENR-S 13	996	ENR-S 13	101		
				ENR-S 18	100	ENR-S 30	72		
	P4			ENR-S 35	925	ENR-S 3	74		
				ENR-S 17	564	ENR-S 27	355/409		
10 µg/L	P5	ENR-S 5	362	ENR-S 14	377	ENR-S 20	645		
		ENR-S 28	2768	ENR-S 20	1636	ENR-S 21	606		
		ENR-S 32	2019	ENR-S 37	911				
	P5	ENR-S 4	97	ENR-S 14	613				
		ENR-S 5	836	ENR-S 7	179				
		ENR-S 8	545	ENR-S 23	1088				
		ENR-S 28	2401	ENR-S 37	919				
	P5	ENR-S 5	4751/1492						
		ENR-S 6	6202/973						
		ENR-S 16	4773						
		ENR-S 28	1763/2059						
		ENR-S 14	250						
		ENR-S 32	2402						
	P6			ENR-S 32	2607	ENR-S 22	3095	ENR-S 24	166
				ENR-S 35	890	ENR-S 26	693		
						ENR-S 37	422		
	P6							ENR-S 36	122
	P6							ENR-S 11	335
								ENR-S 19	247

4.17. DICLOFÉNAC DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Le tableau suivant énumère les métabolites possibles du diclofénac trouvés dans des échantillons de *Salicornia eu.* A première vue, un plus grand nombre de métabolites est observé dans la troisième coupe de la tige de la plante correspondant à la troisième semaine, 21 jours, de manière généralisée dans toutes les concentrations testées. Cependant, la plante P4 aux concentrations intermédiaires présente un grand nombre de métabolites dans presque tous les échantillons analysés, montrant des valeurs de surface importantes dans plusieurs des signaux obtenus.

Le métabolite d'une déméthylation avec perte de fragment $-C_6H_3NCl_2$, correspondant à DCL-S 6, se répète principalement à des concentrations intermédiaires et faibles dans la troisième coupe de la tige et dans la racine de la plante, se retrouve dans toutes les plantes dopées à ces concentrations dans des ordres de grandeur similaires à chaque concentration du dosage analysé. Il convient également de noter qu'il n'apparaît dans aucun des échantillons à forte concentration analysés.

La voie métabolique de la déshydratation des alcools avec perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$ est à l'origine des métabolites DCL-S 3, DCL-S 4 et DCL-S 5, qui apparaissent à plusieurs reprises dans les coupes de la tige de la *Salicornia eu.* principalement exposés à des concentrations intermédiaires, bien que leur présence est également observée à des concentrations élevées de dissolution du dopant. Les valeurs de surface obtenues suggèrent sa formation au début de l'essai, en diminuant la quantité formée de ce métabolite au cours des semaines, en obtenant dans la première semaine des valeurs correspondant à plus de 1300 u.a. et 21 jours d'essai 400 u.a., de sorte que la formation de ce métabolite puisse être liée à la quantité de solution dopante administrée et au temps passé.

Le métabolite DCL-S 9 formé à partir de la molécule mère de diclofénac avec perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$, apparaît de façon répétée à des concentrations intermédiaires et élevées, se trouvant à la fois dans la tige et dans la racine de la plante, prédominant dans presque tous les échantillons après 21 jours d'exposition. Dans ce cas, il convient de noter que les valeurs de surface les plus élevées correspondent aux premières coupes effectuées après 7 et 14 jours d'exposition, ce qui indiquerait que leur présence peut être liée au bon état général de la plante, cessant d'apparaître lorsqu'elle montre des signes clairs de détérioration.

Dans tous les échantillons de la première coupe de la tige de *Salicornia eu.* le métabolite DCL-S 14 de l'hydroxylation avec perte du fragment $-C_6H_3NCl_2$ à un temps de rétention de 5.71 minutes prédomine. Ce métabolite est clairement lié à la concentration de la solution de dopant

d'irrigation puisqu'on observe comment la surface de celle-ci augmente, en diminuant la concentration de dissolution à laquelle les plantes ont été exposées.

En général, un plus grand nombre de métabolites est observé chez les plantes exposées à des concentrations intermédiaires, diminuant considérablement chez celles soumises à de faibles concentrations de dissolution de dopants, les métabolites n'étant pratiquement pas trouvés dans les échantillons à forte concentration ni dans la racine de *Salicornia eu.*

Ces résultats sont largement conformes à ceux de l'ibuprofène. Cela pourrait indiquer que lorsque *Salicornia eu.* est exposé à une forte concentration d'un mélange d'ingrédients actifs, il souffre d'une grande détérioration de sorte que son activité métabolique cesse presque dès le début, cependant, sous une exposition modérée, la plante est initialement activée, probablement pour contrecarrer l'effet, pour finalement subir cette détérioration et donc l'absence des métabolites liés au diclofénac dans la racine.

Au contraire, à de faibles concentrations d'exposition, un comportement très inégal est observé dans les deux plantes soumises à l'essai, puisque bien que dans la plante P5, aucun effet n'est observé avant la troisième coupe, qui pourrait être lié à une faible absorption du principe actif, dans la plante P6, il semble y avoir une réponse très prononcée dans la première coupe, qui est déduite des valeurs de surface obtenues, de cesser brusquement, ce qui indiquerait soit une détérioration notable de celle-ci, soit une adaptation à sa présence, ce qui semble plus que probable, étant donné la présence de plusieurs composés possibles liés au diclofénac dans la racine.

Tableau 33. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec le diclofénac.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1	DCL-S 26	327			DCL-S 16	112/123		
						DCL-S 18	205		
	P1					DCL-S 28	144		
						DCL-S 28	170		
	P1					DCL-S 9	285		
						DCL-S 28	180		
	P2	DCL-S 14	1451	DCL-S 3	1009	DCL-S 9	537	DCL-S 9	117
		DCL-S 27	172	DCL-S 25	764	DCL-S 16	214		
		DCL-S 28	79	DCL-S 27	943				
	P2	DCL-S 27	274	DCL-S 25	814	DCL-S 16	235		
			DCL-S 26	507	DCL-S 37	104			
			DCL-S 27	916					
700 µg/L	P3	DCL-S 9	1910	DCL-S 3	1650	DCL-S 9	306	DCL-S 6	969
		DCL-S 33	96	DCL-S 9	541	DCL-S 6	4383	DCL-S 31	392
						DCL-S 11	1981		
	P3					DCL-S 9	419	DCL-S 6	1124
						DCL-S 23	118	DCL-S 35	772
						DCL-S 6	5278		
	P3					DCL-S 11	1924		
						DCL-S 6	3232	DCL-S 6	1066
						DCL-S-3 11	1555	DCL-S 24	1290
	P4	DCL-S 12	123	DCL-S 4	11796/10171	DCL-S 3	321/401	DCL-S 32	248
		DCL-S 19	397	DCL-S 7	3565/4410	DCL-S 5	60		
		DCL-S 21	377	DCL-S 9	1013/624	DCL-S 30	340/154		
		DCL-S 14	2133	DCL-S 15	384	DCL-S 26	2174		
	P4	DCL-S 3	1369	DCL-S 3	1360/2040	DCL-S 4	604	DCL-S 32	291
		DCL-S 19	362	DCL-S 4	11796/11647	DCL-S 15	876		
		DCL-S 21	285	DCL-S 6	6002/6484	DCL-S 30	609/606		
		DCL-S 14	2094	DCL-S 7	3565	DCL-S 6	4039		
	P4					DCL-S 11	1675		
		DCL-S 8	110	DCL-S 3	1697/1373	DCL-S 5	84	DCL-S 32	360
		DCL-S 9	2516/2547	DCL-S 21	262	DCL-S 9	343		
DCL-S 15		349/372	DCL-S 33	102	DCL-S 18	194			
DCL-S 19		1123	DCL-S-3 11	3457	DCL-S 6	4679			
DCL-S 14		2339			DCL-S 11	1223			
DCL-S 22		242			DCL-S 32	1310			
10 µg/L	P5	DCL-S 36	802	DCL-S-3 11	4781	DCL-S 1	5468/6228	DCL-S 32	844
						DCL-S 25	3060/4134		
						DCL-S 6	6861		
						DCL-S 20	1924		
						DCL-S 26	5547		
	P5					DCL-S 17	1106		
		DCL-S 6	9596			DCL-S 1	11335		
						DCL-S 2	5174		
						DCL-S 25	5342		
						DCL-S 6	6862		
	P5					DCL-S 17	1106		
						DCL-S 1	6118		
						DCL-S 2	4167		
	P6					DCL-S 11	2949		
						DCL-S 6	7798		
				DCL-S 29	2906			DCL-S 34	108
		DCL-S 12	3190					DCL-S 10	1011
		DCL-S 14	4018					DCL-S 12	294
P6	DCL-S 11	2336							
	DCL-S 35	4996							
	DCL-S 14	4578					DCL-S 16	254	

4.18. IBUPROFÈNE DANS *SALICORNIA EUROPAEA*

Le tableau suivant présente les résultats obtenus sur la racine et la tige de *Salicornia eu.* exposées au test avec des solutions dopantes contenant du principe actif ibuprofène. Comme dans les cas précédents, il y avait une forte teneur en métabolites dans la troisième semaine du test d'exposition, troisième coupe de la plante, correspondant à 21 jours.

Une croissance progressive de la quantité de métabolites est observée dès le début de l'essai, n'obtenant que des voies métaboliques dans la première semaine, chez les plantes exposées à des concentrations intermédiaires de dissolution de dopants, P3 et P4, atteignant un équilibre entre l'état de la plante, l'absorption des analytes et le moment de l'administration, jusqu'à acquérir des métabolites dans les plantes soumises à de fortes concentrations des principes actifs P1 et P2, dans la troisième coupe du *Salicornia eu.*

Cette tendance montre la difficulté qu'a la plante à traiter les principes actifs administrés, après que la plupart des analytes aient généré un métabolisme d'hydratation (IBU-S 5; IBU-S 6; IBU-S 7; IBU-S 8), avec les mêmes masses théoriques et formule mais avec un temps de rétention différent, ce qui indique la facilité avec laquelle la plante doit produire ce métabolite.

Les échantillons qui ont été irrigués avec une dilution de l'analyte à une concentration de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ n'ont pas été en mesure de générer de métabolites ni à la racine ni aux tiges, probablement en raison de la faible concentration de dilution à laquelle ils ont été exposés.

Dans la racine de la plante, les voies métaboliques de déméthylation prédominent, étant obtenues dans les plantes soumises à des concentrations intermédiaires et élevées de solutions dopantes.

Tableau 34. Possibles métabolites trouvés dans les plantes de *Salicornia europaea* soumis à des tests d'exposition avec l'ibuprofène.

		Coupe 1		Coupe 2		Coupe 3		Racine	
		Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone	Métab.	Zone
10 mg/L	P1					IBU-S 1	4490		
	P1					IBU-S 1	4716		
	P1					IBU-S 5	1417		
	P1					IBU-S 1	3302		
	P1					IBU-S 5	1014		
	P1					IBU-S 6	701		
	P2			IBU-S 5	1588	IBU-S 1	3688	IBU-S 1	2949
	P2			IBU-S 6	1122	IBU-S 2	4819	IBU-S 2	3692
	P2			IBU-S 7	823	IBU-S 5	1508	IBU-S 3	1131
	P2					IBU-S 6	968		
	P2			IBU-S 5	1782	IBU-S 2	3822	IBU-S 1	2537
	P2			IBU-S 6	1050	IBU-S 1	2729	IBU-S 2	3709
	P2			IBU-S 7	898			IBU-S 3	559
	P2					IBU-S 2	4121		
700 µg/L	P3	IBU-S 5	5264	IBU-S 5	5302	IBU-S 6	919	IBU-S 1	279
	P3	IBU-S 6	2719	IBU-S 6	1098	IBU-S 7	670		
	P3			IBU-S 7	520	IBU-S 5	1312	IBU-S 1	263
	P3					IBU-S 6	755	IBU-S 2	226
	P3					IBU-S 7	493	IBU-S 5	94
	P3					IBU-S 5	938		
	P3					IBU-S 6	496		
	P4	IBU-S 5	4143	IBU-S 5	2976	IBU-S 5	2007	IBU-S 1	520
	P4	IBU-S 6	2789	IBU-S 6	1655			IBU-S 2	683
	P4			IBU-S 7	839			IBU-S 3	685
	P4	IBU-S 5	4400	IBU-S 5	2694	IBU-S 5	2245		
	P4	IBU-S 6	3112	IBU-S 6	1304	IBU-S 1	749		
	P4	IBU-S 8	3367	IBU-S 6	1945				
	P4			IBU-S 7	829				
10 µg/L	P5								
	P5								
	P5								
	P6								
	P6								
	P6								

5. RÉSULTATS D'ANALYSE ENZYMATIQUE

La collection de 150 plantes extraites avec quatre solvants différents; éthanol, hexane, acétate d'éthyle et eau: éthanol (50:50, v/v), constitue un total de 600 échantillons testés avec les enzymes tyrosinase, collagénase, élastase et lipoxygénase. Parmi tous les résultats obtenus, seuls ceux dont l'inhibition enzymatique est supérieure à 50 % ont été retenus comme critères de sélection, de sorte que les extraits végétaux puissent présenter un intérêt commercial [144].

Une fois l'activité enzymatique analysée et les échantillons dont l'activité était supérieure à 50 % sélectionnés, une revue bibliographique a été effectuée pour éliminer les plantes pour lesquelles il existait des études antérieures avec les enzymes utilisées dans cette thèse. Ainsi seuls cinq échantillons ont continué l'étude, pour déterminer, identifier et isoler la partie ou fraction de l'échantillon qui présente une inhibition de l'enzyme, avec pour objectif de l'intégrer dans le développement de nouveaux ingrédients actifs cosmétiques naturels, car aucune documentation bibliographique faisant référence à l'inhibition de ces plantes avec les enzymes étudiées n'a été trouvée. Les extraits ou fractions naturels qui présentent une bioactivité élevée ne peuvent généralement pas être incorporés directement dans une formulation, car ils peuvent présenter des qualités indésirables, telles que l'odeur, la couleur, la viscosité, etc. Il est donc nécessaire d'ajouter un support cosmétique approprié (liquide ou solide) pour faciliter l'incorporation d'ingrédients actifs naturels dans une formulation cosmétique [214].

Dans cette thèse, nous nous sommes essentiellement concentrés sur la détermination des fractions d'échantillons d'extraits de plantes sélectionnées qui inhibent ces activités enzymatiques. L'identification et l'isolement de ces molécules feront l'objet d'études ultérieures.

Dans le cas de **l'enzyme tyrosinase**, dont les inhibiteurs sont utilisés pour leurs applications en tant qu'agents de blanchiment de la peau, et dans le traitement des troubles dermatologiques [144], sur toute la collection de plantes analysées, les seuls échantillons qui ont montré une forte inhibition sont le n° 129 extrait dans un mélange H₂O: EtOH (1:1, v/v) (*Pistacia lentiscus*) avec le substrat L-Tyrosine, qui a atteint un pourcentage d'inhibition proche de 60 % et l'échantillon n° 78 extrait dans l'éthanol correspondant à la plante *Lycianthes rantonnetii* avec le substrat L-DOPA.

La plante *Pistacia lentiscus* est largement utilisée comme inhibiteur de diverses enzymes, en particulier ses feuilles sont, selon les études de I.Chiocchio et al. [215] un puissant inhibiteur de la tyrosinase, comme le démontrent les travaux de López et al. [216], il est donc rejeté pour les analyses suivantes.

Cependant, la plante *Lycianthes rantonnetii* (n° 78) présentait un pourcentage d'inhibition de 57 % pour l'enzyme tyrosinase avec le substrat L-DOPA, et comme aucune référence bibliographique n'a été trouvée pour cette plante comme inhibiteur de cette enzyme, elle a été sélectionnée pour fractionnement dans la phase suivante.

Des résultats obtenus à partir de **l'enzyme lipoxygénase**, seuls les extraits, 46 issus de l'extraction à l'acétate d'éthyle et l'éthanol, ont montré une inhibition supérieure à 50 % à l'enzyme, dans le cas de la plante n° 46, *Hemerocallis*, une inhibition enzymatique de 71 % est observée dans l'extrait d'éthanol et 51 % dans l'acétate d'éthyle.

Le reste des échantillons positifs correspondent à des plantes qui contiennent une molécule qui inhibe l'enzyme et qui est documentée dans la bibliographie consultée, c'est pourquoi ils ne sont pas considérés comme de nouveaux inhibiteurs, par exemple l'échantillon N° 49 correspondant à la plante *Prunus cerasifera* avec une inhibition proche de 100 % dans nos résultats, correspond aux études réalisées par Florence T. et al. [217], ainsi que les têtes de fleurs d'*Euryops pectinatus* dans les essais réalisés par Nesseem D.I. et al. [218] présentent une forte activité anti-inflammatoire liée à cette enzyme, cette plante appartient à la famille des *Asteraceae*, même famille que la plante N° 3 de notre collection *Anacyclus radiatus*, avec une inhibition de 75 % extrait dans l'éthanol, rejeté pour essais suivants car l'activité anti-inflammatoire de la famille à laquelle il appartient est documentée [219, 220].

Ainsi que l'*Eucalyptus* (n° 1) dont un inhibiteur de flavonoïde lipoxygénase a été isolé dans des études menées par Shwu-Woan [221] ou la plante n° 78, sélectionnée avec l'enzyme tyrosinase, mais rejetée avec la lipoxygénase, bien que les extraits dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle présentent une inhibition supérieure à 65 % et il n'existe toujours pas de références bibliographiques sur leur rôle dans l'inhibition de cette enzyme, la famille à laquelle appartient *Solanaceae*, est largement documentée dans son activité anti-inflammatoire, comme le reflètent les études de Nacoulma et al. [222], Helvace S. et al. [223] ou Khan et al. [224].

La plante 78 montre un pourcentage d'inhibition avec l'enzyme lipoxygénase de 50 %, bien qu'aucune étude n'ait démontré l'inhibition de *Lycianthes rantonnetii* avec cette enzyme. Il a été documenté l'activité anti-inflammatoire de plusieurs plantes appartenant à la famille des *Lycianthes rantonnetii*, les *Solanaceae*, comme le sont les tests réalisés in vitro des activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de *Nicotiana tabacum* L. appartenant à la même famille réalisée par Nacoulma et al. [222], ce qui implique que cet échantillon est éliminé dans l'étude de l'enzyme lipoxygénase.

L'extrait 57 éthanol et 57 acétate d'éthyle avec une inhibition supérieure à 80 et 50 % respectivement, de la plante *Viburnum tinus*, appartenant à la famille des *Adoxacées*, ont une activité anti-inflammatoire connue en raison de la forte teneur en anthocyanines et autres polyphénols comme mentionné dans les travaux de Crisan M. et al. [225] ou Olenic L. et al. [226], qui excluent ces extraits.

Avec l'enzyme élastase, tous les échantillons à forte inhibition sont des plantes déjà connues ou étudiées avec cette enzyme, par exemple la plante n°1, *Eucalyptus* avec une inhibition enzymatique supérieure à 80 % avec tous les solvants sauf l'hexane, est déjà documentée dans le travail Inomata et al. [227].

Les extraits n° 23, *Nerium oleander* dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle, inhibent plus de 50 % de l'activité de l'enzyme élastase, tandis que dans les solvants hexane et eau : éthanol (1 :1, v/v) son pourcentage d'inhibition n'atteint pas 10 %, ceci est dû, comme mentionné ci-dessus, à l'effet du solvant sur les molécules présentes dans les plantes, en extrayant plus ou moins de molécules des plantes, cette plante appartenant à la famille des *Apocynaceae*, ainsi que la plante n° 124 *Petite salmon oleander* selon les études menées par A. Rajic et al. [228] dans l'écorce des racines de plantes appartenant à cette famille ont trouvé des composés qui inhibent l'enzyme élastase, donc ces extraits sont rejetés dans notre étude.

Avec **l'enzyme collagénase**, presque tous les échantillons présentent une inhibition inférieure à 50 %, semblable à ce que l'on observe avec l'enzyme tyrosinase et le substrat L-Tyrosine, à l'exception de certains extraits végétaux qui sont déjà connus pour leur relation avec cette enzyme, comme extrait n° 52 dans l'acétate d'éthyle avec une inhibition supérieure à 90 % avec l'enzyme collagénase et proche de 50 % dans ses études avec l'enzyme lipoxygénase, mais supprimé dans les analyses suivantes car son activité avec l'enzyme et même avec l'enzyme hyaluronidase a été démontrée dans les recherches menées par Persson et al. [229]. Par conséquent, aucun extrait n'a été sélectionné pour l'étude de l'inhibition de l'enzyme collagénase.

Il en va de même pour les extraits de la plante n° 27 correspondant à l'onction d'Arbousier avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 75 % dans tous les solvants sauf l'hexane, mais dont l'activité inhibitrice de l'enzyme élastase a été précédemment décrite dans les recherches de Seibu Y. et al. comme appartenant à la famille des *Ericaceae* [230].

Compte tenu de ce qui précède, les fractions actives qui présentent une inhibition avec les enzymes ont été sélectionnées pour identifier, l'échantillon 78 dans l'éthanol pour l'enzyme tyrosinase avec le substrat L-DOPA, pour l'enzyme lipoxygénase les échantillons 46 dans l'éthanol,

46 dans l'acétate d'éthyle et avec l'enzyme élastase 46 dans l'acétate d'éthyle qui sont mis en évidence dans le jaune dans le tableau de l'annexe III.

Ces plantes (figures 49 et 50) ont été dissoutes dans leurs solvants correspondants à une concentration de $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ puis extraites pendant 15 minutes dans le bain ultrasonique, deux heures de macération avec agitation, filtration et évaporation du solvant, reconstituant les échantillons dans le méthanol à une concentration finale de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Figure 49. Plante n° 46
Hemerocallis.



Figure 50. Plante n° 78
Lycianthes rantonnetii.

5.1. ANALYSE DES FRACTIONS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE RÉOLUTION EN HPLC

Les nouveaux extraits obtenus à partir des plantes *Hemerocallis* et *Lycianthes rantonnetii* ont été analysés à l'aide d'un système Agilent 1200 HPLC, avec un détecteur à matrice de diode DAD et un ELSD (détecteur à diffusion de lumière par évaporation) qui fonctionne dans les conditions indiquées dans le tableau 35, conditions développées et optimisées pour une utilisation dans des essais similaires par le groupe de recherche, Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale de l'Institut de Chimie de Nice.

Afin d'identifier la partie bioactive responsable de l'activité enzymatique et d'essayer d'isoler la molécule responsable, une fois l'échantillon injecté, l'éluant a été recueilli en fractions toutes les 2 minutes à la sortie de la colonne, après séparation chromatographique (voir annexe IV). Chaque extrait a ensuite été évaporé à sec et dissous avec différents volumes de DMSO pour obtenir une concentration finale de $3.433 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Ces nouvelles fractions ont été testées avec les enzymes correspondantes, afin de savoir quelle fraction de la plante a été inhibée et de l'isoler, mais, étonnamment, aucune fraction des échantillons 78 et 46 avec leurs solvants respectifs n'a montré une IC_{50} élevée, ce qui implique qu'aucune fraction n'est clairement responsable de cette inhibition enzymatique.

Par conséquent, une analyse a été effectuée en utilisant UHPLC-Q-TOF-MS, dans les conditions décrites au tableau 36, afin d'établir une relation entre les inhibiteurs standard utilisés dans les essais enzymatiques et les échantillons sélectionnés avec inhibition aux enzymes, modifiant le gradient de séparation et modifiant la colonne chromatographique.

Tableau 35. Conditions de séparation et conditions chromatographiques utilisées dans l'analyse HPLC des fractions.

Colonne	C18 Phenomenex, Luna ® (150 x 4.6 mm id, 5 µm)			
DAD	254, 220, 280 nm.			
ELSD	Pression du gaz de nébulisation: 3.5 bars. Température du tube d'évaporation: 40°C. Gain : 3			
Éluants	A: Acide formique 0.1 % dans l'eau. B: Acide formique 0.1 % dans l'acétonitrile. C: 2-propanol.			
Flux	1 mL/min.			
Volume d'injection	20 µL			
Gradient	Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)
	0	95	5	0
	5	95	5	0
	40	55	45	0
	50	0	100	0
	52	0	100	0
	58	0	20	80
	60	0	20	80
	65	0	0	100
	70	0	0	100
	75	95	5	0

Tableau 36. Séparation et conditions chromatographiques utilisées dans l'analyse UHPLC-Q-TOF-MS.

Colonne	ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 x 4.6 mm id, 1.7 µm)			
Éluants	A: Acide formique 0.1 % dans l'eau. B: Acide formique 0.1 % dans de l'acétonitrile. C: 2-propanol.			
Flux	0.5 mL/min.			
Volume d'injection	5 µL.			
Gradient	Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)
	0	95	5	0
	5	95	5	0
	40	55	45	0
	50	0	100	0
	52	0	100	0
	58	0	20	80
	60	0	20	80
	65	0	20	80
	70	0	60	40
	75	95	5	0

Une fois les chromatogrammes des extraits végétaux 46 EtOH, 46 AcEt et 78 EtOH, ainsi que les inhibiteurs standard utilisés dans les tests enzymatiques obtenus, les échantillons ont été traités à l'aide du logiciel MetaboLynx, d'essayer de trouver une relation entre les plantes ayant des résultats positifs à l'activité enzymatique des enzymes lipoxygénase et tyrosinase et les inhibiteurs standard connus des deux, c'est-à-dire d'essayer d'identifier dans quelle partie du chromatogramme des plantes sélectionnées se trouve la ou les molécules responsables de cette inhibition. A cette fin, on tente d'identifier dans ces extraits soit les inhibiteurs de référence standard, soit les métabolites de ces inhibiteurs standards, soit des molécules de structure plus complexe, dont le spectre de fragmentation produit des ions qui coïncident avec les inhibiteurs de référence standard utilisés dans les tests enzymatiques.

Les extraits obtenus dans les solvants acétate d'éthyle et éthanol sont ceux qui présentent une plus grande inhibition enzymatique, ce qui pourrait s'expliquer selon les travaux de Burger et al. par le fait que les solvants polaires et spécifiquement l'éthanol sont appropriés pour l'extraction des polyphénols et flavonoïdes des matrices végétales [144].

Dans la plante *Hemerocallis*, extraite à l'éthanol, une fois les résultats traités et analysés (tableau 37 et figure 51), on observe la présence d'un métabolite provenant d'une hydroxylation de quercétine, avec un temps de rétention de 6.58 minutes (figures 53 et 54).

Avec des temps de rétention de 4.78 et 14.06 minutes (figure 52), on a obtenu des pics chromatographiques liés d'une certaine façon à la molécule de quercétine. L'analyse détaillée de ces pics chromatographiques et de leurs spectres de masse correspondants (figures 54 et 55), a montré des spectres contenant des pics aux relations m/z coïncidant avec la quercétine et leurs fragments correspondants (303.050, 273.040 et 257.045), mais le pic de base de ce spectre montre une relation m/z 465.105 pour le signal obtenu à 14.06 minutes et 423.094 dans le cas de 4,78 minutes (figure 55).

De cette analyse, on peut déduire qu'il s'agit de molécules plus complexes qui partagent une structure avec la molécule de quercétine, puisqu'elles ont un spectre de fragmentation qui coïncide avec celui-ci. Ceci peut expliquer pourquoi la plante s'oppose à l'activité enzymatique de la lipoxygénase et de la tyrosinase, car il semble y avoir une similitude structurelle, et sa présence est très abondante dans les échantillons analysés, ce qui est déduit des valeurs élevées de la surface maximale obtenue. C'est peut-être la raison pour laquelle l'extrait n° 46 EtOH présente une opposition à l'activité de la réaction enzymatique de l'enzyme lipoxygénase inhibant 71.63 % (voir tableau en annexe III).

L'analyse de l'extrait à l'acétate d'éthyle (figures 56 et 57), montre la présence de pics chromatographiques aux temps de rétention coïncidant avec l'extrait dans l'éthanol, dont les spectres présentent une coïncidence totale, ce qui signifie que la molécule (ou les molécules) responsable de l'inhibition enzymatique, a été extraite dans les deux solvants organiques. Les chromatogrammes et les spectres correspondants sont présentés au tableau 38 et aux figures 58 et 59. L'échantillon 46 extrait avec de l'acétate d'éthyle montre une inhibition avec l'enzyme lipoxygénase de 51.48 %, alors qu'il présente un pourcentage d'inhibition de 51.19 % contre l'activité de l'enzyme élastase.

L'analyse de la plante *Lycianthes rantonnetii* extraite à l'éthanol, (extrait n° 78 EtOH), qui présentait une inhibition de l'enzyme lipoxygénase, a été initialement orientée vers la recherche du resvératrol (inhibiteur utilisé pour l'enzyme lipoxygénase) ou de molécules qui lui sont liées, sans

obtenir de résultats positifs dans ce sens. Cependant, comme décrit dans la littérature et comme mentionné précédemment dans l'introduction, les flavonoïdes agissent également comme inhibiteurs compétitifs de l'enzyme lipoxigénase, de sorte que le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait (figure 60) a été traité par la quercétine comme inhibiteur de référence.

La quercétine liée à l'enzyme tyrosinase, entraînée par l'interaction hydrophobe, produit un changement de conformation de l'enzyme en chélatant un cuivre avec les groupes 3' et 4' - dihydroxy, de sorte que la chélation empêche l'entrée du substrat et empêche ainsi l'activité catalytique de l'enzyme tyrosinase [231], agissant en concurrence pour la liaison L-dopa du site de l'enzyme [232], comme l'ont montré les travaux de Kubo et al., dans lesquelles ils démontrent l'activité inhibitrice de la tyrosinase avec les flavonols (classe des flavonoïdes) [233].

De plus, les études de Sohretoglu et al. suggèrent que les flavonoïdes, en particulier ceux qui contiennent une substitution 3', 4'-dihydroxyle dans le cycle B (voir partie expérimentale) ont un potentiel élevé pour le développement d'un inhibiteur de l'enzyme tyrosinase, car la présence d'un groupe hydroxy supplémentaire en position C-3' augmente l'effet inhibiteur de tyrosinase [234].

La figure 61 montre le chromatogramme des ions extraits à un rapport m/z 303.0501 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de la quétine. Le spectre du pic chromatographique obtenu à 11.78 minutes (figure 62), contient un fragment dont la masse coïncide avec celle de la quercétine, bien qu'on observe que le pic de base du spectre est à 465.1034 m/z , ce qui suggère une molécule de structure plus complexe avec une similitude structurale avec la quercétine, dont la fragmentation génère un spectre coïncident entre autres la masse de celle-ci à 303.0501 m/z .

Comme on peut le voir sur la figure 61, le pic chromatographique obtenu à 12.41 minutes présente une coïncidence complète entre le temps de rétention et le spectre de masse avec le contrôle de la quercétine de référence standard analysé, puisque ce signal se retrouve également dans le chromatogramme du contrôle de la quercétine, avec un spectre qui présente un pic de base à 611.1618 m/z (figure 63), en plus des fragments qui coïncident avec le spectre de quercétine (303.050 ; 273.040 et 257.045). Cela pourrait donc expliquer que l'échantillon d'EtOH 78 présente un pourcentage d'inhibition de 57 % avec l'enzyme tyrosinase et le substrat L-DOPA.

Dans de futurs travaux de recherche, on tentera d'analyser par RMN la partie des extraits de plantes contenant des métabolites de quercétine afin d'identifier exactement la molécule responsable de l'inhibition enzymatique.

Analyse de la plante *Hemerocallis* extrait avec EtOH : échantillon 46 EtOH.

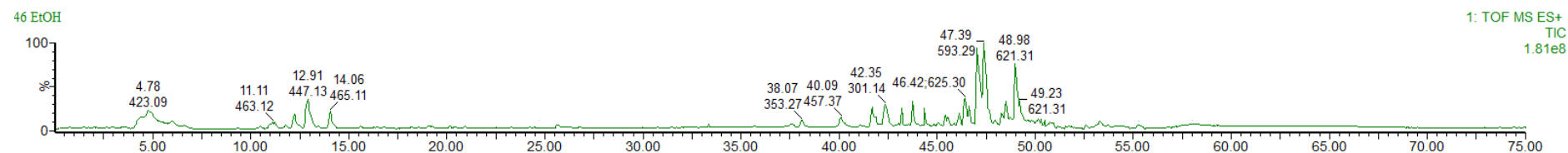


Figure 51. Chromatogramme ionique total obtenu à partir de la plante *Hemerocallis* extraite avec EtOH.

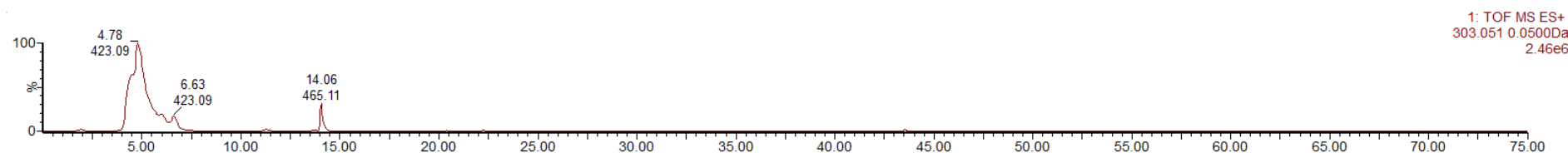


Figure 52. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z quercétine dans l'échantillon 46 EtOH.

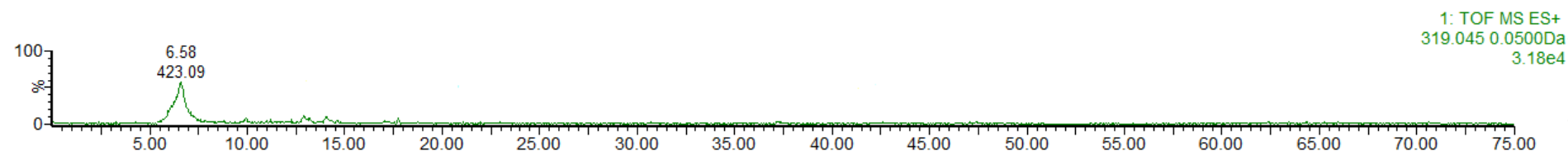
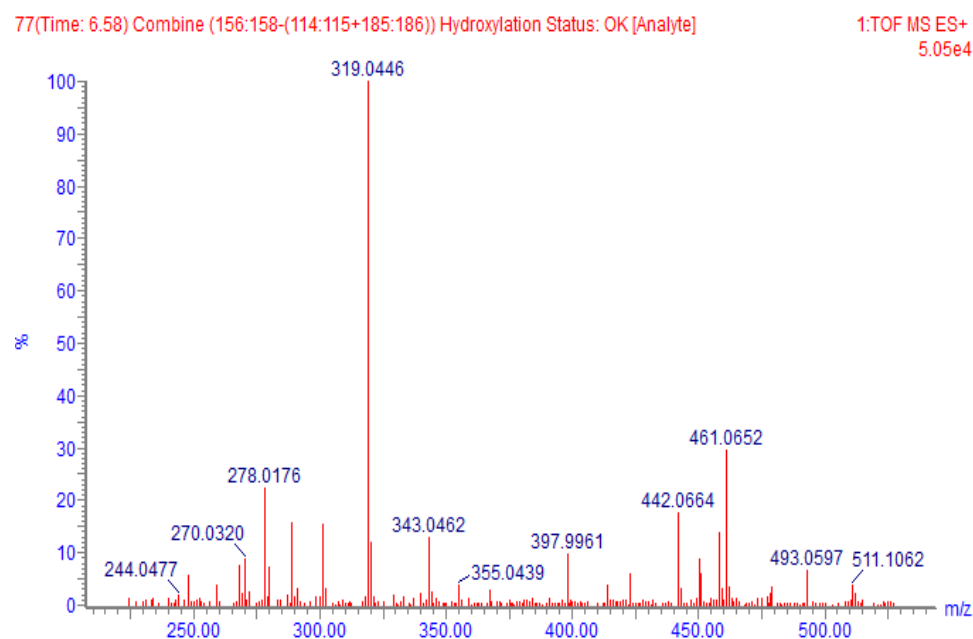
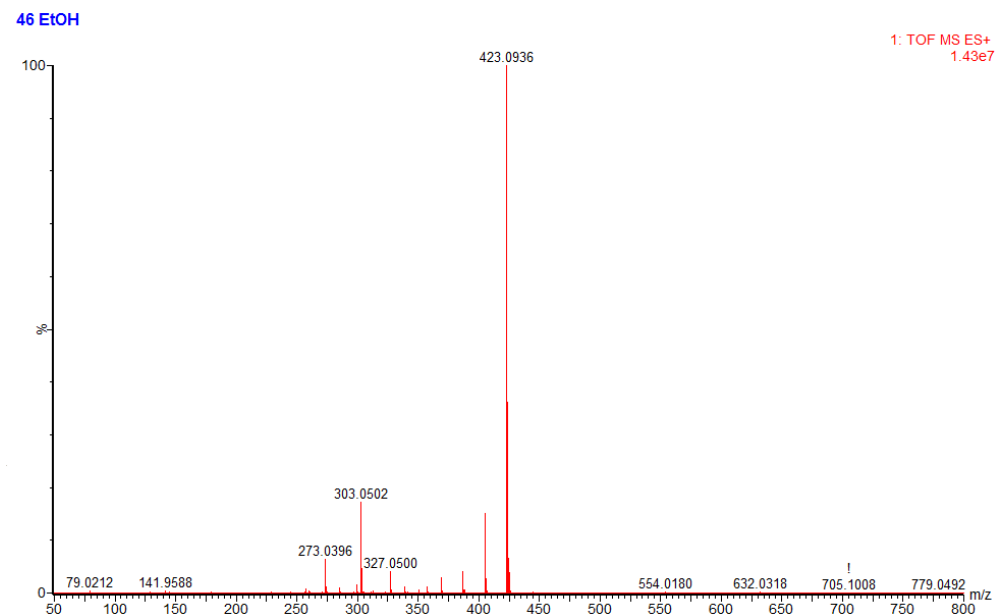


Figure 53. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z du métabolite possible obtenu par hydroxylation dans l'extrait 46 EtOH.

Tableau 37. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 46 EtOH.

Masse théorique	m/z trouvé	tr minutes	Erreur (ppm)	Formule	Voie	Zone
318.0376	319.0446	6.58	-2.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	Hydroxylation	13077
302.0427	303.0503	4.82	-0.5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	1715439
302.0427	303.0505	14.06	0.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	152094

**Figure 54.** Spectre obtenu à partir du métabolite possible de l'hydroxylation de l'échantillon 46 EtOH avec un temps de rétention de 6.58 minutes.**Figure 55.** Spectre obtenu à partir de l'échantillon de 46 EtOH avec un temps de rétention de 4.78 minutes.

Analyse de la plante *Hemerocallis* extraite avec AcEt: échantillon 46 AcEt.

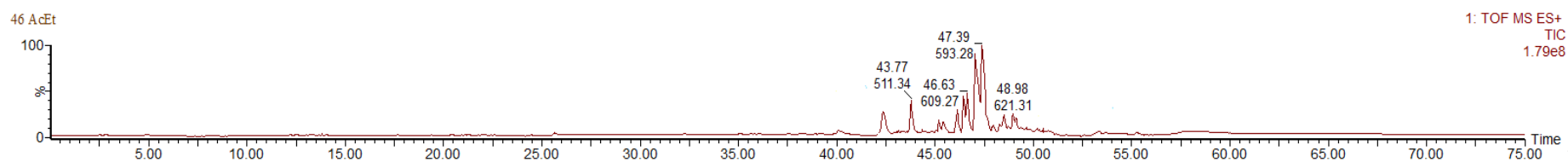


Figure 56. Chromatogramme ionique total obtenu à partir de la plante *Hemerocallis* extraite avec AcEt.

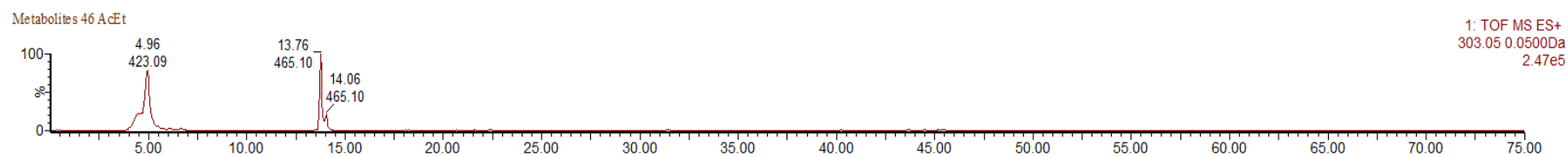
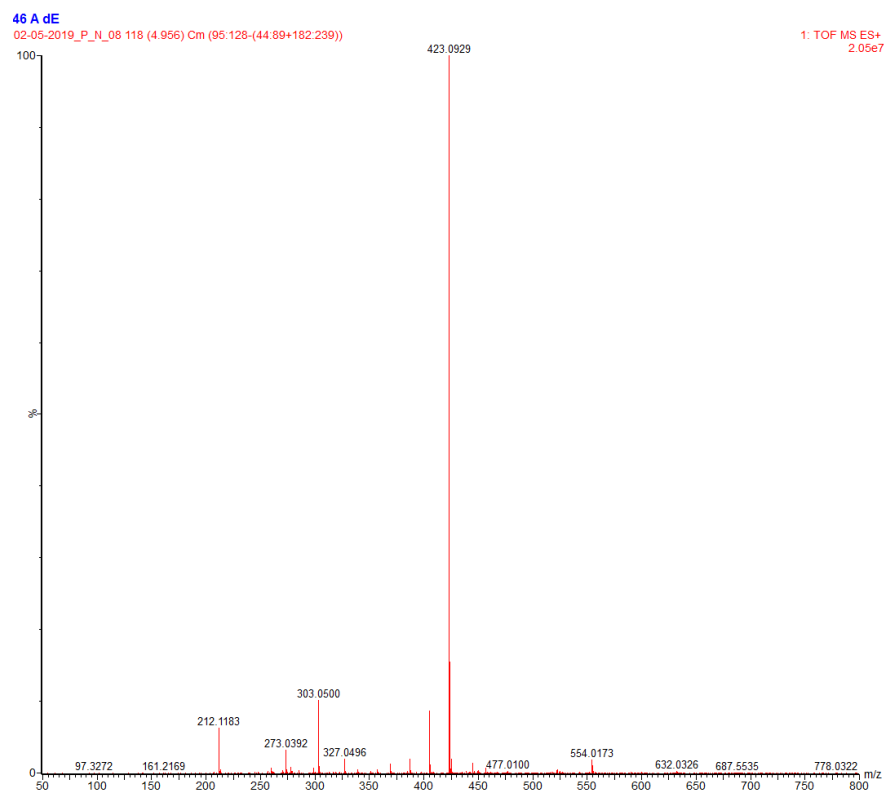
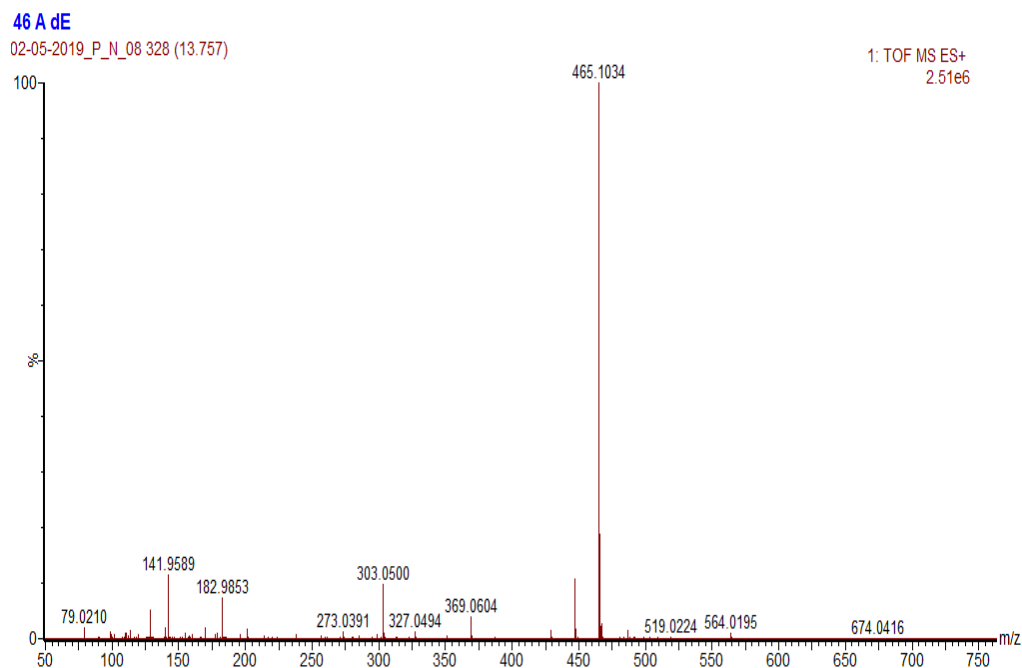


Figure 57. Chromatogramme des ions extraits en relation m/z de quercétine dans l'échantillon 46 AcEt.

Tableau 38. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 46 AcEt.

Masse théorique	m/z trouvé	tr minutes	Erreur (ppm)	Formule	Voie	Zone
302.0427	303.0501	4.96	-1.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	69762
302.0427	303.0501	13.76	-1.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	37003


Figure 58. Spectre obtenu de l'échantillon de 46 AcEt à temps de rétention de 4.96 minutes.

Figure 59. Spectre obtenu à temps de rétention de 13.76 minutes.

Analyse de la plante *Lycianthes rantonnetii* extraite avec EtOH :  chantillon 78 EtOH.

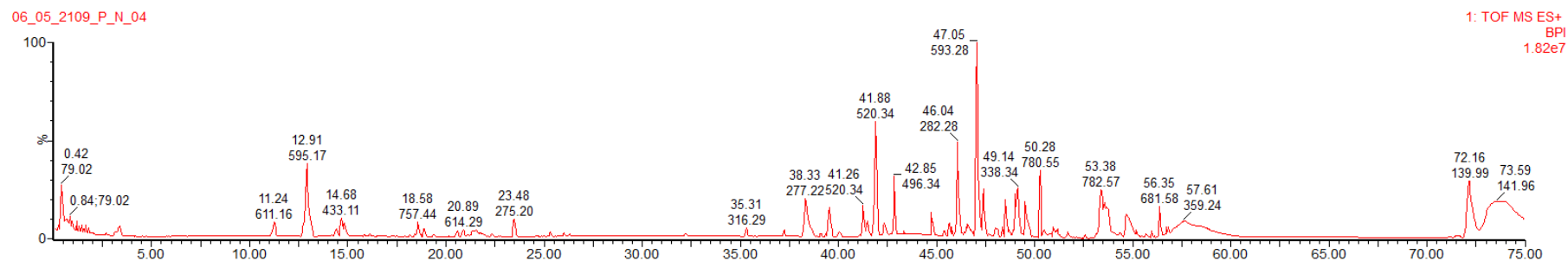


Figure 60. Chromatogramme obtenu à partir de la plante *Lycianthes rantonnetii* extraite avec EtOH.

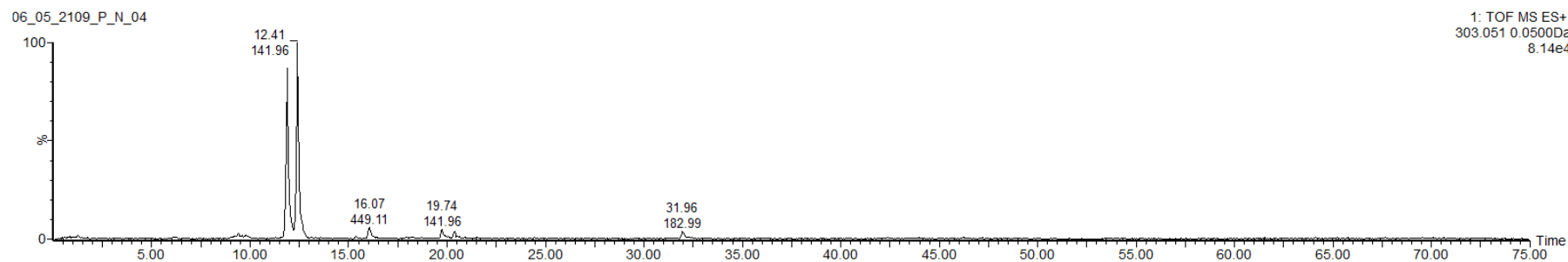
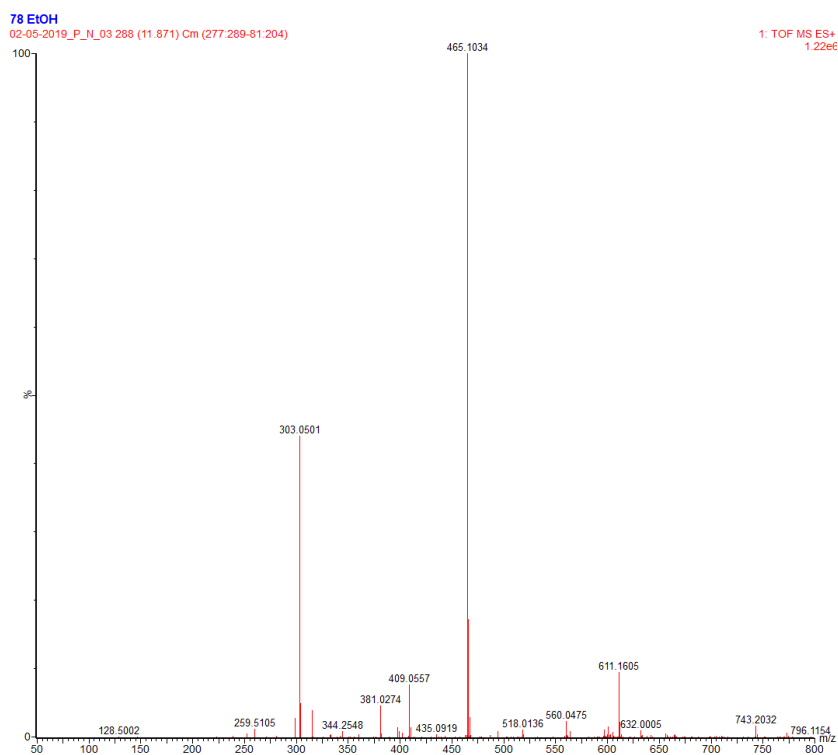
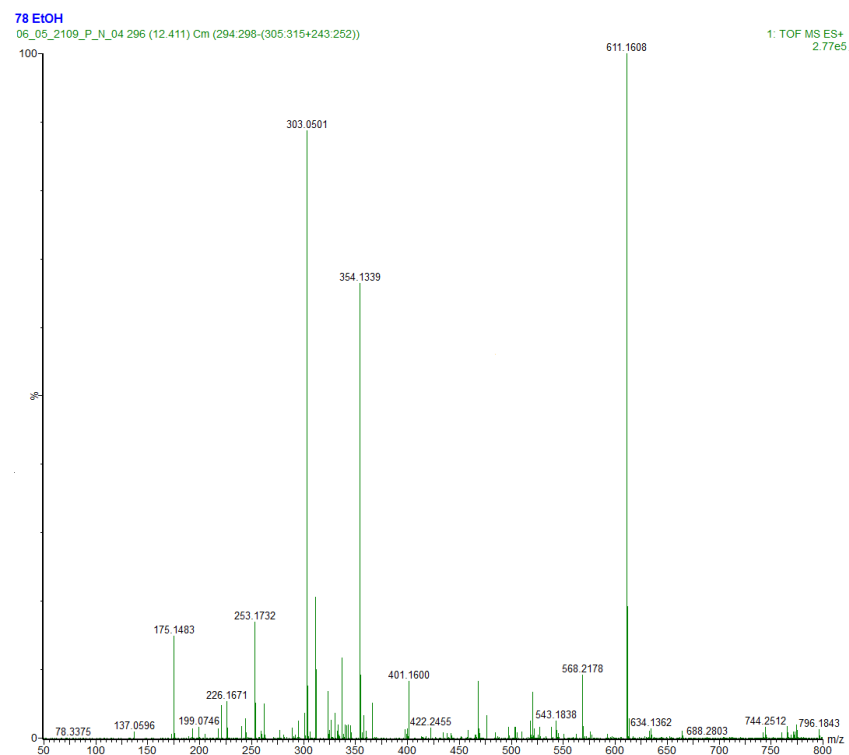


Figure 61. Chromatogramme obtenu à partir des pics contenant la masse de quercétine de l'échantillon 78 EtOH.

Tableau 39. Possibles métabolites obtenus à partir de l'échantillon 78 EtOH.

Masse théorique	m/z trouvé	tr minutes	Erreur (ppm)	Formule	Voie	Zone
303.0502	303.0502	11.87	-0.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	119312
302.0427	303.0502	12.41	-0.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Parent	13733

**Figure 62.** Spectre obtenu à un temps de rétention de 11.87 minutes.**Figure 63.** Spectre obtenu à un temps de rétention de 12.41 minutes

5.2. RÉSULTATS DES ESSAIS ANTIOXYDANTS

L'annexe III, les pourcentages d'inhibition des enzymes utilisées ainsi que les résultats obtenus à partir des analyses des polyphénols, des flavonoïdes et des DPPH des extraits des échantillons utilisés dans ces travaux sont inclus.

On observe comment les échantillons qui présentent une activité antioxydante élevée, montrent une forte inhibition avec l'enzyme lipoxigénase, comme c'est le cas de l'échantillon n° 18 *Olea ambrensis* H. Perrier. dont les pourcentages d'inhibition avec l'enzyme lipoxigénase avec près de 72 % extrait avec H₂O/EtOH, et supérieur à 95 % dans les extraits avec les solvants EtOH, AcEt, présentant une teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes, ainsi que des activités antioxydantes dans les essais DPPH, celles-ci étant maximales dans l'extrait formé à partir d'EtOH dépassant 70 % de l'activité antioxydante, tandis qu'aucune activité enzymatique n'a été observée avec l'extrait formé à partir d'hexane.

Il en va de même pour les extraits de l'échantillon n° 21, correspondant à la plante *Jaraconde minosifolia*, qui présente une activité antioxydante de 90 % pour l'extrait obtenu dans H₂O/EtOH et supérieure à 80 % extrait avec EtOH, une inhibition de l'activité de l'enzyme lipoxigénase supérieure respectivement à 73 % et 95 %, en plus ce dernier extrait présente une teneur élevée en polyphénols. Un scénario similaire se produit dans l'échantillon n° 22 *Myrtus communis* L., extrait avec des activités antioxydantes H₂O/EtOH et EtOH supérieures à 90 % ont été observées dans les tests DPPH ainsi qu'une inhibition supérieure à 90 % dans les tests enzymatiques lipoxigénase avec les deux solvants.

L'échantillon n° 46, sélectionné dans cette étude, *Hémérocallis*, avec un pourcentage d'inhibition de l'enzyme lipoxigénase de 71.36 % extrait dans l'éthanol et de 51.48 % pour l'extrait formé dans l'acétate d'éthyle, présente une activité antioxydante supérieure ainsi qu'une teneur supérieure en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait d'éthanol que dans l'acétate d'éthyle.

Comme cela a été largement documenté dans la bibliographie, ainsi que dans les travaux de Burger et al. [144], il semble y avoir une relation claire entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes, avec la forte activité antioxydante et l'inhibition de l'enzyme lipoxigénase, bien que cette relation ne soit pas remplie avec le reste des enzymes, probablement parce que les polyphénols ou flavonoïdes ne sont pas en concurrence avec ces activités enzymatiques.

Une situation identique est observée dans les échantillons n° 54, dont les extraits de H₂O/EtOH et EtOH, présentent une activité antioxydante d'environ 60 % et une inhibition de l'enzyme lipoxigénase de près de 80 %, dans l'échantillon n° 57 appartenant à la plante *Viburnum Tinus* des inhibitions ont été obtenues pour la lipoxigénase supérieure à 80 % extrait avec EtOH, et

de 51.79 % pour l'extrait d'AcEt, ainsi qu'une activité antioxydante supérieure à 80 % et une teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes, pour tous les extraits à l'exception de celui obtenu avec l'hexane, qui ne présente aucune activité antioxydante, ni teneur en polyphénols et flavonoïdes, ainsi que mentionné dans les études par Burger et al., la présence des solvants polaires permet l'extraction des polyphénols et flavonoïdes des matrices végétales [144].

Cette corrélation entre la teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes, l'activité antioxydante élevée et la forte inhibition des enzymes en particulier, la lipoxygénase enzymatique se produit surtout chez les plantes qui sont connues pour leurs activités anti-inflammatoires et qui ont été étudiées précédemment pour leurs capacités antioxydantes.

Les résultats extraits des échantillons de *Juncus sp.* soumis à des tests d'exposition soumis aux différents tests antioxydants (DPPH et polyphénols) et enzymatiques (lipoxygénase, élastase et tyrosinase) énumérés à l'annexe III, montrent un pourcentage d'inhibition de l'enzyme lipoxygénase supérieur à 40 % pour l'échantillon de la plante P1, coupé dans la première semaine, dopée à des concentrations élevées de solution dopante $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ et extraite avec de l'acétate d'éthyle et une inhibition proche de 22 % pour la deuxième coupe de la plante P1 extraite dans l'éthanol, tandis que la plante P2, également exposée à des concentrations élevées de solution dopante de principes actifs, présente entre la première et la troisième coupe une inhibition entre 10 et 18 % dans les extraits d'éthanol.

Une forte activité antioxydante est observée dans les dosages DPPH des échantillons P1, P2 et P3 extraits avec $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ contrairement à ceux extraits avec de l'hexane, dont les résultats étaient généralement proches de zéro. De plus, la tige de *Juncus sp.* présente une plus grande capacité d'inhibition contre les enzymes que la racine, malgré le fait que dans la racine de la plante des concentrations plus élevées d'accumulation des principes actifs ont été obtenues.

En général, comme on pouvait s'y attendre, les échantillons soumis à de fortes concentrations de solutions dopantes des principes actifs présentent une teneur plus élevée en polyphénols et flavonoïdes et un pourcentage plus élevé d'inhibition enzymatique, contrairement à ceux qui sont dopés à de faibles concentrations, ce qui montre l'altération interne qui survient chez les plantes exposées aux principes pharmacologiquement actifs.



CONCLUSIONES

Del trabajo de investigación de esta tesis se han obtenido las siguientes conclusiones:

1.- Se ha optimizado y validado un procedimiento analítico utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detección de espectrometría de masas-tiempo de vuelo para el análisis de seis principios activos farmacológicos, ciprofloxacina, enrofloxacin, carbamazepina, flumequina, ibuprofeno y diclofenaco, en extractos de tres especies vegetales: *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* y *Salicornia europaea*, especies presentes en diferentes hábitats del Parque Nacional de Doñana (España). El procedimiento permite recuperaciones de entre el 60 y el 100% para la carbamazepina en todas las matrices, alrededor del 70% para enrofloxacin y ciprofloxacina, del 70% para ibuprofeno y entre el 80 y el 90% para diclofenaco. Flumequina fue el principio activo que presentó mayor dependencia de la matriz, con recuperaciones entre el 60 y el 100% en función de tallos en todas la especie vegetales y parte de la misma analizada.

2.-Se ha diseñado y realizado un ensayo de exposición sometiendo ejemplares de las especies vegetales seleccionadas a riegos con disoluciones acuosas conteniendo concentraciones variables de los principios activos ya mencionados. Se han analizado las diferentes partes de las plantas realizando cortes a los 7, 15, 21 y 30 días (fin del ensayo).

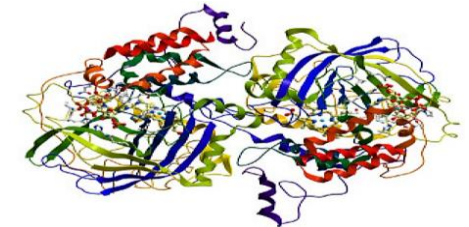
3.- Se han evaluado las cantidades de principio acumuladas en las diferentes partes de las plantas a lo largo del ensayo de exposición.

4.- Se han identificado los posibles metabolitos generados en las diferentes partes de las plantas sometidas al ensayo de exposición, y las principales rutas metabólicas que pudieran estar implicadas, mediante el análisis masivo de los datos cromatográficos a través de un software apropiado (MetaboLynxTM). Se han evaluado los resultados atendiendo a la concentración de principios activos en el agua de riego, tiempo de ensayo, parte de la planta y evolución fisiológica aparente de los ejemplares vegetales.

5.- Se han recolectado ejemplares de 150 especies vegetales presentes en el Parque Nacional de Doñana y su entorno, y se han realizado extracciones de estos usando disolventes de diversa polaridad y capacidad extractante: hexano, etanol, agua: etanol (1:1, v/v) y acetato de etilo. En los extractos obtenidos se ha evaluado la capacidad de inhibición enzimática (tirosinasa, elastasa, colagenasa, lipoxigenasa) así como la capacidad antioxidante.

6.- Se ha determinado una relación metabólica entre las posibles moléculas bioactivas de los extractos de las plantas que no están documentados en la bibliografía por su actividad de inhibición enzimática y los inhibidores conocidos de dichas enzimas, explicando la existencia de la actividad inhibidora.

7.- Los métodos enzimáticos y antioxidantes se han aplicado a las muestras seleccionadas de los ensayos de exposición de *Juncus sp.*, justificando como era de esperar el aumento de la capacidad inhibidora a las enzimas en las muestras sometidas a altas concentraciones de disoluciones dopantes.



CONCLUSIONS

Les conclusions suivantes ont été tirées des travaux de recherche de cette thèse :

1.- Une procédure analytique a été optimisée et validée par chromatographie liquide à haute résolution avec détection du temps de vol par spectrométrie de masse pour l'analyse de six principes pharmacologiques actifs, carbamazépine, fluméquine ciprofloxacin, enrofloxacin, ibuprofène et diclofénac, dans des extraits de trois espèces végétales, *Lavandula dentata*, *Juncus sp.* et *Salicornia europaea*, espèces présentes dans différents habitats du Parc National de Doñana (Espagne). La procédure permet de récupérer entre 60 et 100 % de carbamazépine dans toutes les matrices, environ 70 % pour l'enrofloxacin et la ciprofloxacin, 70 % pour l'ibuprofène et entre 80 et 90 % pour le diclofénac. La fluméquine était l'ingrédient actif le plus dépendant de la matrice, les taux de récupération se situant entre 60 et 100 % selon les tiges chez toutes les espèces végétales et une partie d'entre elles était analysée.

2.- Un test d'exposition a été conçu et réalisé en soumettant des spécimens des espèces végétales sélectionnées à une irrigation avec des solutions aqueuses contenant des concentrations variables des principes actifs déjà mentionnés. Les différentes parties des plantes ont été analysées en effectuant des coupes à 7,15, 21 et 30 jours (fin de l'essai).

3.- Les quantités de principes accumulées dans les différentes parties des plantes pendant l'essai d'exposition ont été évaluées.

4.- Les possibles métabolites générés dans les différentes parties des plantes soumises à l'essai d'exposition, ainsi que les principales voies métaboliques susceptibles d'être impliquées, ont été identifiés grâce à l'analyse massive des données chromatographiques par un logiciel approprié (MetaboLynxTM). Les résultats ont été évalués en fonction de la concentration des principes actifs dans l'eau d'irrigation, du temps d'essai, d'une partie de la plante et de l'évolution physiologique apparente des spécimens de la plante.

5.- Des spécimens de 150 espèces végétales présentes dans le Parc National de Doñana et ses environs ont été collectés et extraits à l'aide de solvants de polarité et de capacité d'extraction différentes : hexane, éthanol, eau : éthanol (1:1, v/v) et acétate d'éthyle. Dans les extraits obtenus, la capacité d'inhibition enzymatique (tyrosinase, élastase, collagénase, lipoxigénase) ainsi que la capacité antioxydante ont été évaluées.

6.- Une relation métabolique a été déterminée entre les molécules bioactives possibles d'extraits de plantes qui ne sont pas documentées dans la bibliographie pour leur activité d'inhibition enzymatique et les inhibiteurs connus de ces enzymes, expliquant l'existence d'une activité inhibitrice.

7.- Les méthodes enzymatiques et antioxydantes ont été appliquées aux échantillons sélectionnés à partir des tests d'exposition des *Juncus sp.* justifiant comme prévu l'augmentation de la capacité inhibitrice des enzymes dans les échantillons soumis à de fortes concentrations de solutions dopantes.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Camacho Muñoz D., Martín Bueno J., Santos Morcillo J.L., Aparicio Gómez I., Alonso Álvarez E. Contaminantes emergentes en las aguas del Parque Nacional de Doñana. Univesidad de Sevilla. Departamento de Química Analítica. Ponencia. (2012) ISBN: 978-84-7993-225-1.
- [2] Encinas Malagón M.D. Medio ambiente y contaminación. Principios básicos (2011). ISBN: 978-84-615-1145-7.
- [3] J.A. López Geta, M. Martín Machuca, C. Mediavilla Laso, A. Cosano Prieto, J.L. Girón Méndez. Guía didáctica de los acuíferos del Parque Natural Sierra Norte de Sevilla. Volumen I. Las agua subterráneas. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España. Diputación de Sevilla (2011). ISBN: 978-84-7840-862-7
- [4] Soluciones Medioambientales y Aguas, S.A.: <http://www.smasa.net/sustancias-contaminantes-agua/>
- [5] Manual de depuración de aguas residuales urbanas. Alianza por el agua/Ecología y desarrollo. Monográficos agua en Centroamérica [3]. Edición: Ideasmares. Depósito legal: Z-2802/08.
- [6] Avilés M., Sánchez M., Ramírez N. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua: Proyecto “Métodos analíticos para determinación de compuestos emergentes en aguas”. Secretaría de Medioambiente y recursos naturales. 2015.
- [7] Castillo J. R. Contaminantes emergentes en el siglo XXI: Una visión general. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón. Dpto. Química Analítica. F. Ciencias. Universidad de Zaragoza. (2016). Escuela Politécnica Superior de Huesca.
- [8] AINIA. Restos de antibióticos en aguas: El problema de los contaminantes emergentes. <https://www.ainia.es/noticias/restos-de-antibioticos-en-aguas-el-problema-de-los-contaminantes-emergentes/>
- [9] Barceló L.D., López de Alda M.J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC-Barcelona). Fundación Nueva Cultura del Agua. Panel Científico-Técnico de seguimientos de la política de Aguas. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerios de Medio Ambiente. 2008.
- [10] Meironyté Guvenius D., Bergman A., Norén K. Polybrominated Diphenyl Ethers in Swedish Human Liver and AdiposeTissue. *Archives of environmental contamination and toxicology* (2001) 40, 564-570.

- [11] Villagrasa M., Lopez de Alda M., Barceló D. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review (2006). *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 953:972.
- [12] Correia A., Marcano L., (2015) Presence and elimination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plants. Worldwidereview and nationalperspective. *Boletín de malariología y salud ambiental*. LV (1): 1-18.
- [13] Urbano G. (2011). Principios básicos de farmacología: Farmacocinética. 1ª edición. Editorial Lito-Formas, San Cristóbal, Venezuela.
- [14] Rodríguez Pérez R. Influencia de los fármacos presentes en el agua residual sobre la resistencias de la bacteria *Escherichiacoli* y su eliminación por oxidación avanzada. Departamento de Ingeniería civil: ordenación del territorio urbanismo y medioambiente. E.T.S.I. de Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Madrid (2013).
- [15] Reis R. W., Barreiro J., Vieira E. &Bezerra Q. (2007) Fármacos, ETES e Corpos Hídricos. *Revista Ambiente e Água – An interdisciplinary Journal of Applied Science*. 3, 54-61.
- [16] Contreras Carvajal A. El diclofenaco en especies salvajes: Situación actual. Departamento de sanidad animal. Unidad de toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura (2016).
- [17] Halling-Sorensen B., Jensen J., Tjornelund J., Montforts M.H.M.M (2001). Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. *Pharmaceuticals in the envinonment*. 13: 143-157.
- [18] Drillia P., Stamatelatou K. &Lyberatos G. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* (2005). 60: 1034-1044.
- [19] Hernando M.D., Mezcua M., Fernández-Alba A.R., Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* (2006) 69, 334-342.
- [20] Díaz-Cruz M.S., Barceló D. LC-MS² trace analysis of antimicrobials in wáter, sediment and soil. *TrACTrends in Analytical Chemistry* (2005) 24, 645-657.
- [21] Vanesa Ferradis Tébar. Farmacocinética y farmacodinamia. Fisioterapeutas de Castilla y León (2013).

- [22] Aleixandre A. Puerro M. Capítulo 1: Absorción y distribución de los fármacos. Farmacología básica. Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. (2009) Editorial Médica Panamericana. ISBN: 8498351685.
- [23] Nortes Méndez R. Estudio del metabolismo del ibuprofeno en orina humana mediante hplc-ms de alta resolución. Facultad de ciencias experimentales. Universidad de Jaén (2014).
- [24] Del Arco C. Metabolismo de los fármacos. Farmacología humana. 3ª Edición. Masson S.A. ISBN: 84-458-0613-0.
- [25] Jhon D. Ruiz B. M.V. Factores fisiológicos que modifican la acción de los fármacos en medicina veterinaria. *Rev Col. Cienc. Pec.* (2001) 14, 36-48.
- [26] Cortacans Torre J.A., Hernández Lehmann A., Del Castillo González I., Montes Carmona E., Hernández Muñoz A. Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación. Departamento del Territorio, Urbanismo y Medioambiente. E.T.S. Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Madrid. III Congreso de Ingeniería civil, territorio y medioambiente. “Agua, diversidad e ingeniería” (2006).
- [27] Scharf, S., Gans, O. y Sattelberger, R. ArzneimittelwirkstoffeinmZu- undAblauf von Kläranlagen. Umweltbundesamt Wien, Report UBA-BE-201 (2002).
- [28] Drewes J.E., Heberer T. and Reddersen K. Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse. *Water Science and Technology.* (2002). 46, 73-80.
- [29] Petrović, M. Hernando, D., Díaz-Cruz, S. y Barceló, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A.* (2005) 1067. 1-14.
- [30] Heberer T., Reddersen K. and Mechlinski. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology.* (2002). 46, 81-88.
- [31] Tejada C. Quiñonez E. Peña M. Emergingcontaminants in warter: Pharmaceuticalresidues. A review. Facultad de ciencias básicas. Universidad Militar Nueva Granada. ISSN 1900-4699. (2014) 10, 80-101.
- [32] Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology.* (2002) 266, 175-189.

- [33] Clara M., Strenn B., Ausserleitner M. and Kreuzinger N. Comparison of the behaviour of selected micropollutants in a membrane bioreactor and a conventional wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*. (2004). 50, 29-36.
- [34] Daughton, C.G., Ternes, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* (1999). 107, 907-938.
- [35] European Medicines Agency. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP) meeting of 9-11 December 2014. <https://www.ema.europa.eu/en/news/committee-medicinal-products-veterinary-use-cvmp-meeting-9-11-december-2014>.
- [36] AchucarroLindon, N. Diclofenac in vultures: Could it be the cause of the decline of the Spanish population? Departamento de Toxicología y farmacología. Facultad de Veterinaria UCM. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. ISSN:1988-2688.(2017) 11, 253-258.
- [37] Green R. E., Newton I., Shultz S. Cunningham A.A., Gilbert M., Pain D.J. y Prakash V. Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *J. Appl. Ecol.* (2004) 41, 793-800.
- [38] Rodríguez Bernardino A. Asociación entre el consume de antiinflamatorios no esteroideos y la aparición o descompensación de insuficiencia cardiaca congestiva. Estudio de casos y controles. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. ISBN: 84-669-2134-6. (2003).
- [39] Day R., Morrison B., Luza A., Castaneda O., Strusberg A., Nahir M., Helgetveit K.B., Kress B., Daniels B., Bologneses J., Krupa D., Seidenberg B., Ehrich E. A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX-2 inhibitor rofecoxibvs ibuprofen in patients with osteoarthritis. Rofecoxib/ Ibuprofen Comparator Study Group. *Arch. Intern. Med.* (2000) 160, 1781:1787.
- [40] Díaz D., Picco E. Lesiones provocadas por antiinflamatorios no esteroides en caninos y felinos. Panorama actual del medicamento. ISSN: 0210-1394. (2008) 32, 312-374.
- [41] Anadón Navarro A., Martínez Larrañaga, M.R., Residuos de medicamentos de uso veterinario: Toxicología alimentaria. Ediciones Días de Santos. ISBN: 978-84-9969-199-2.
- [42] Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Fichatécnica: Diclofenaco Llorens 75mg solucióninyectable EFG.

- [43] Kepp, D. R., Sidemann, U. G., Tjørnelund, J., Hansen, S. H. Simultaneous quantitative determination of the major phase I and II metabolites of ibuprofen in biological fluids by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *Journal of Chromatography B* (1997), 696:235-241.
- [44] Moraes de Oliveira A. R., Malagueño de Santana F. J., Sueli Bonato P. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* (2005) 538, 25-34.
- [45] Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica: Carbamazepina Normon 200 mg comprimidos EFG.
- [46] Carbamazepina ALTER 200 mg EFG, comprimidos. Laboratorios ALTER, S.A. Madrid.
- [47] Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica: Tegretol 200 mg comprimidos.
- [48] Hernández Hernández F., Morell Evangelista I., Ibáñez Martínez M. Problemática asociada a la presencia de metabolitos y productos de transformación de fármacos en las aguas del entorno mediterráneo. Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas. Universitat Jaume I. (2018).
- [49] Miguña Vergas C., Solari Zerpa L. Nuevas y viejas quinolonas. *Rev.Med.Hered.* (2002),13, 153-160.
- [50] Fernando J Doti M.V. Uso práctico de los antibióticos en la clínica de pequeños animales. 1ª Edición (2009). Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. ISBN: 978-950-555-359-4.
- [51] Otero J.L., Mestorino N., Errecalde J.O. Enrofloxacin: una flumequina de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. ISSN: 1514-2590. *Analecta Veterinaria*. (2001) 21, 31-41.
- [52] Cué Bruguera M., Morejón García M., Salup Díaz R. Actualidad de las quinolonas. *Rev. Cubana Farm.* ISSN: 1561-2988 (2005) 39, (1).
- [53] Marín Carrillo P., Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD). Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia (2008).
- [54] Vademecun. Ciprofloxacina. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c058.htm>.

- [55] Martín H., Rubio Langre S., Daer M. Evolución de los niveles séricos de enrofloxacin y su metabolito activo, ciprofloxacin, tras administración intramuscular y subcutánea en llamas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. ISSN: 1988-2688. (2007) 1, 468-474.
- [56] Gabarda Cassinello M.L. Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación controladas para enrofloxacin en ovino. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. (2013).
- [57] SCHEER. M. Concentrations of active ingredient in the serum and in tissue after oral and parenteral administration of Baytril®. *Veterinary Medicine Review*. (1987) 2, 104-118.
- [58] Ministerio de Sanidad y consumo. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Medicamentos veterinario: Flumes y vaporemezcla. Laboratorios Syva S.A. (2008).
- [59] Ministerio de Sanidad, servicios sociales e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Departamento de medicamentos veterinarios. Ganadil Flumequina polvo oral para administración en agua de bebida. Industrial veterinaria, S.A. (2009).
- [60] Ávalos García A., Pérez-Urria Carril. E. Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología vegetal) Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. ISSN: 1989-3620 (2009) 2 (3), 199-145.
- [61] Martínez Rodríguez R.M. Influencia del riego sobre el rendimiento en cultivo de tres especies del género *Thymus*. Estudio de la variabilidad intraespecífica. Tesis Doctoral. Departamento de biología vegetal (Fisiología Vegetal) Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Instituto Murciano de Investigación y desarrollo agrario y alimentario (2008).
- [62] Dudareva, N., Pichersky, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology* (2000). 122: 627-633.
- [63] Sotomayor, J. A. Estudio sobre Plantas Aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el SE Ibérico, para su establecimiento como cultivo. (1998) Universidad de Murcia.
- [64] Fu Q., Zhang J., Borchardt D., Schlenk D., Gan J. Direct Conjugation of Emerging Contaminants in Arabidopsis: Indication for an Overlooked Risk in Plants? *Environ. Sci. Technol.* (2017) 51, 6071-6081.
- [65] He Y., Langenhoff A.A.M., Sutton N.B., Rijnaarts H.H.M., Blokland M.H., Chen F., Huber C., Schröder P. Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environ. Sci. Technol.* (2017) 51, 4576-4584.

- [66] Riemenschneider C., Seiwert B., Moeder M., Schwarz D., Extensive Transformation of the Pharmaceutical Carbamazepine. Following Uptake into Intact Tomato Plants. *Environ. Sci. Technol* (2017) 51, 6100-6109.
- [67] Campos del Pozo, V.M., Fitorremediación de contaminantes persistentes: Una aproximación biotecnológica utilizando Chopo (*Populus sp.*) como sistema modelo. Tesis Doctoral. Escuela técnica superior de ingenieros de montes. Universidad Politécnica de Madrid (2010).
- [68] Figura célula vegetal: <https://www.educa2.madrid.org/web/argos/inicio/-/visor/la-celula-vegetal>.
- [69] Pierattini E.C., Franchini A., Huber C., Sebastiana L., Schöder P. Poplar and diclofenac pollution: A focus on physiology, oxidative stress and uptake in plant organs. *Science of the Total Environment*. (2018) 636, 944-952.
- [70] Huber, C., Bartha, B., Schröder, P., Metabolism of diclofenac in plants – Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J. Hazard. Mater.* (2012) 243, 250–256.
- [71] Huber, C., Preis, M., Harvey, P.J., Grosse, S., Letzel, T., Schröder, P. Emerging pollutants and plants - metabolic activation of diclofenac by peroxidases. *Chemosphere*. (2016) 146, 435–441.
- [72] Tejedor C.M. Biorremediación. Dpto Bioquímica y biología molecular. Química Ambiental. Facultad de Química. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid (2006). http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/biorremediacion.pdf
- [73] Ferrera-Cerrato R., Roja-Avelizapa N.G., Poggi-Varaldo H.M., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R.O. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* (2006) 48 (2), 179-187.
- [74] Pérez Vasco M. G. Evaluación de la capacidad degradadora y acción de biorremediación de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de la florículapencaflor. Facultad de Ingeniería y ciencias agropecuarias. Universidad de las Américas (2014).
- [75] Hernández Acosta E., Rubiños Panta J.E., Alvarado López J. Restauración de los suelos contaminados con hidrocarburos: Conceptos básicos. Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Publicaciones Diamante. 1ª Edición (2004) ISBN: 968-839-477-5.

- [76] Korda, A., P. Santas, A. Tenente and R. Santas. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology Biotechnology*. (1997) 48, 677-686.
- [77] Poirier-Larabie, S., Segura, P.A., Gagnon, C., 2016. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Sci. Total Environ.* 557–558, 257–267.
- [78] Kummerová, M., ZezulkaS., Babula, P., Trískac, J. Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant Lemnaminor. *J. Hazard. Mater.* (2016) 302, 351–361.
- [79] Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* (2014) 148, 221–230.
- [80] Bartha, B.; Huber, C.; Schröder, P. Uptake and metabolism of diclofenac in *Typhlatifolia*—How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Sci.* (2014), 227, 12–20.
- [81] Shenker, M.; Harush, D.; Ben-Ari, J.; Chefetz, B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants - A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* (2011) 82, (6), 905–910.
- [82] Malchi, T.; Maor, Y.; Tadmor, G.; Shenker, M.; Chefetz, B. Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ. Sci. Technol.* (2014), 48 (16), 9325–9333.
- [83] Morales Salinas N.E., ¿Qué es un bioindicador? Aprendiendo a partir del ciclo de indagación guiada con macroinvertebrados bentónicos. Propuesta Metodológica. Trabajo de investigación Universidad de Colombia, Facultad de Ciencias. (2011) Leticia, Colombia.
- [84] Moraes S.; Palau A.; Silva P. Aplicação de métodos físicos, químicos e biológicos na avaliação da qualidade das águas em áreas de aproveitamento hidrelétrico da bacia do rio São Tomás, município de Rio Verde Goiás. En: Sociedade & Natureza, Uberlândia. (2009) 21.392-412.
- [85] Viteri-Garcés M.I, Chalen-Medina J.A., Cevallos-Revelo Z.I., Determination of water quality indicators and protocols in the Baba Hydroelectric Power Station. *Dom. Cien.* (2017) 3, 628-646. ISSN: 2477-8818.
- [86] <http://www.maremundi.com/contaminacion>
MareMundi/MundoMarino/Medioambiente/Contaminación/Bioindicador.

- [87] Zúñiga de Cardozo M.; Caicedo G. Indicadores ambientales de calidad del agua en la cuenca del río Cauca. Bioindicadores ambientales de la calidad del agua. Universidad del Valle. Cali. Colombia (1997).
- [88] Anze R.; Franken M.; Zaballa M.; Renee Pinto M.; Zeballos G.; Cuadros M., Canseco A., De la Rocha A., Estellano V., Del Granado S. Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. Unidad de Calidad Ambiental, Instituto de Ecología. Carrera de Biología. UMSA, La Paz. Bolivia. Revista Virtual REDESMA (2007).
- [89] Isasi Catalá E. Los conceptos de especies indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en ecología de la conservación. *Interciencia* (2011), 36 (1), 31-38. ISSN: 0378-1844.
- [90] Ribera I.; Foster G. El uso de artrópodos como indicadores biológicos. *Bol SEA*. (1997) 20, 265-276.
- [91] Morales R.; Quintanar A.; Cabezas F.; Pujadas A.J.; Cirujano S.; Castroviejo S. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol XII Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae. Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid. (2010).
ISBN: 978-84-00-09041-8, tomo XII.
- [92] Ryman D. Aromaterapia: Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales. Los usos en belleza, cocina y salud. Ed. Kairos. Barcelona (1995)
ISBN: 9788472453036.
- [93] Fraga i Arguimbau P.; Jardinería mediterránea sin especies invasoras. Colección manuales técnicos biodiversidad. Valencia (2009). Generalitat Valenciana. Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda. (Manuales técnicos; 1). ISBN: 978-84-482-5256-4.
- [94] Cervellini P.M.; Angeletti S. Salicornia, la vedette dentro del mundo vegetal. Artículo INBIOSUR (Instituto de Investigaciones Biológicas y Biomédicas del Sur), Bahía Blanca.
- [95] Loconsole D.; Cristiano G.; De Lucia B. Glassworts: From Wild Salt March species to sustainable Edible Crops. *Agriculture* (2019) 9, 14, 1:12.
- [96] Castroviejo S.; Laínz M.; López González G.; Montserrat P.; Muñoz Garmendia F.; Paiva J.; Villar L. Pedrol J.; Soriano C. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol II Platanaceae-Plumbaginaceae (partim). Real Jardín Botánico CSIC. Madrid (1990).
ISBN: 84-00-07034-8, tomo II.

- [97] Davy A.J.; Bishop G.F.; Costa C.S.B. *Salicornia* L (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball&Tutin, *S. nitens* P.W. Ball&Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball&Tutin and *S. dolichostachya* Moss) *Journal of Ecology* (2001) 89, 681-707.
- [98] <https://www.flores.ninja/salicornia/>
- [99] <https://www.vitonica.com/proteinas/la-salicornia-un-vegetal-rico-en-proteinas>
- [100] <https://www.vitonica.com/alimentos/que-es-la-salicornia-un-supervegetal-ideal-para-deportistas>
- [101] Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Volumen XVII, Butomaceae-Juncaceae. Talavera Lozano, S.; Gallego C.; Romero Z.; Herrero A. Castrovaiejo S. ISBN: 978-84-00-09112-5. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid (2010).
- [102] Foto *Juncus* sp.: Natural History Museum of Crete.University of Crete. Greece, Aegean, Cyclades, Milos Island. Rush, *Juncus* sp.; Photo by Averamakis M. NHMC © Avramakis M. (2006).
- [103] Martín Martínez I. Depuración de aguas con plantas emergentes. Unidad de botánica agrícola E.T.S.I.A. Ministeria de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaría general de estructuras agrarias. Hojas Divulgadoras. Número 16/89 HD. Ciudad Universitaria. Madrid.
- [104] Jara Biedma R. Estudio de las interacciones metal-biomolécula en organismos modelo *Mus musculus*/*Mus spretus*. Diagnóstico de problemas ambientales. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva. Facultad de Ciencias Experimentales. Departamento de Química y Ciencia de los materiales (2014).
- [105] Fernández J.A. Guía de campo del Parque Nacional de Doñana. (1982) Omega, Barcelona.
- [106] Huelva Información. ¿Qué es Doñana? El Parque Nacional de Doñana está considerado como la mayor reserva ecológica de Europa con un ecosistema único en el mundo. (2017) https://www.huelvainformacion.es/huelva/Donana_0_1148585163.html
- [107] Vioque Fernández A. Biomarcadores en cangrejo de río (*Procambarusclarkii*) para evaluar la contaminación del Parque de Doñana y el Estuario del Guadalquivir por metales y plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. (2008) ISBN-13: 978-84-7801-929-8.

- [108] El Confidencial: El mapa del incendio de Doñana: el área afectada por el fuego de Moguer. (2017) https://www.elconfidencial.com/espana/andalucia/2017-06-26/mapa-incendio-donana-area-afectada-fuego-huelva-moguer-mazagon_1405332/
- [109] Fernández Cisnal R. Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. (2016).
- [110] Castaño Corral A.; Mateos Mateos J.; Rivera Silva M.L.; Ruiz de Larramendi A., García Canseco V.; Pérez de Ayala Sánchez J.M. Guía de visita del Parque Nacional de Doñana. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Canseco Editores S.L. (2010) ISBN: 978-84-8014-779-8.
- [111] Destino Doñana. Club de Productos Doñana. <https://destinodonana.com/people/fauna/>
- [112] San Miguel Ayanz A.; Agudín Menéndez S.; Garzón Heydt P.; Guil Celada F.; Inogés García J.; Silvestre Barrio F.; González García L.M.; García Domínguez F.M.; Fernández Olalla M.; Martínez Jaúregui M.; Muñoz Igualada J.; Rodríguez Vigal C.; Alda Pons F.; Doadrio Villarejo I.; Hernández Segovia M. Manual para la gestión del hábitat del lince ibérico (*Lynx pardinus*) y de su presa principal, el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) (2006). ISBN: 978-84-69062-04-3.
- [113] Porras Martín J.; Nieto López-Guerrero P.; Álvarez-Fernández C.; Fernández Uría A., Gimeno M.V. Calidad y coordinación de las aguas subterráneas en España. Informe de síntesis. IGME (1985).
- [114] Albaiges J.; Algaba J.; Arambarri P.; Cabrera F.; Baluja G., Hernández L.; Castroviejo J. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain) *Sci Tot Environ* (1987) 63, 13-28.
- [115] Castroviejo J. Mapa del Parque Nacional de Doñana. CSIC. Estación biológica de Doñana. (1993).
- [116] Grimalt, J. O.; Ferrer M.; Macpherson E. The minetailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* (1999) 242, (1-3), 3-11.
- [117] Vertidos tóxicos al río Guadiamar. Propuestas técnicas para su corrección. Trabajo de campo. Ensayos de laboratorio. Diseño de actuaciones. Planes estratégicos. Grupo de tratamiento de Aguas residuales. Escuela Universitaria Politécnica. Universidad de Sevilla. Diputación de Sevilla (1998).

- [118] Cabrera F.; Murillo Carpio J.M.; Madejón P.; Domínguez M.T.; Burgos P.; Madejón E.; Marañón T.; Pérez de Mora A.; Rosario C.; Moreno Lucas F.; Gorón Moreno I.F. Los suelos del Guadamar: contaminación por elementos traza tras el accidente minero de Aznalcóllar. Junta de Andalucía (2008). ISBN: 978-84-96776-05-0.
- [119] Saura J.; Bayán B.; Casas J.; Larramendi, A.R.; Urdiales, C. Documento Marco para el Desarrollo del Proyecto Doñana 2005. Mº Medio Ambiente (2001) Madrid.
- [120] Tovar-Sanchez A.; Huerta-Diaz M.A.; Negro J.J.; Bravo M.A.; Sanudo-Wilhelmy, S.A. Metal contamination in interstitialwaters of Donana Park. (2005) J Environ Manage.
- [121] Arambarri P.; Cabrera F.; González-Quesada R. Quality of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). (1996) *Science of the Total Environment* 191, 185-196.
- [122] Albaiges J.; Algaba, J.; Arambarri, P.; Cabrera, F.; Baluja, G.; Hernandez L.M.; Castroviejo J. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain). *Science of the Total Environment* (1987) 63, 13-28.
- [123] WWF Informe. Contaminación del agua en Doñana. Evaluación de los vertidos sin depurar de los municipios de Almonte, Rociana del Condado y Bollullos Par del Contado (Comarca de Doñana, Huelva) (2012).
- [124] Martín Gómez M.C.; Ballesteros González M. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Sección departamental de química analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Departamento de química analítica e ingeniería química. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá. Madrid. Real Academia Nacional de Farmacia (2010).113-168.
- [125] Abián J.; Carrascal M.; Gay M. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC, IDIBAPS. Barcelona (2008). Proteómica. 2. 16-35.
- [126] Plascencia Villa G. Espectrometría de Masas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Cuernavaca. Morelos México (2003).
- [127] Ayala Betón Camilo de Regil Hernández R. Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. Métodos de bioquímica. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca. Morelos. México (2004).

- [128] March R E. An Introduction to Quadrupole IonTrap Mass Spectrometry. (1997) *Journal of Mass Spectrometry* 32: 351-369.
- [129] Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* (2000) 72, 1156.
- [130] Hu Q, Noll R J, Li H, Makarov A. et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* (2005) 40, 430-443.
- [131] Egea Mellado J.M.; Curso “on-line” de cribado neonatal. Tema 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tandem (MS/MS). Laboratorio de Metalopatías. Centro de Bioquímica y Genética Clínica. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. El Palmar. Murcia. (2014).
- [132] Boyle J. G.; Whitehouse C M. Time-of-flight mass spectrometry with an electrospray ion beam. *Analytical Chemistry* (1992) 64:2084-2089.
- [133] Ortiz Benevides F.L. Jhon Florez G. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Básicas Tecnologías e Ingeniería. Programa de Ingeniería de Alimentos. 305689-Biotecnología. Pasto. Colombia (2012).
(https://www.academia.edu/16949849/Contenido_Biotecnologia_305689_actualizado).
- [134] Merino Pérez J.; Noriega Borge M.J. Fisiología General. Tema 2B; Bloque I: Enzimas. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Cantabria. (2011).
- [135] De Lera Satín A. Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. (2011).
- [136] Merino Pérez J.; Noriega Borge M.J. Fisiología General. Tema 2A; Bloque I: Biomoléculas. Proteínas. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Cantabria. (2011).
- [137] Franco Vera L. Enzimas: Qué son y para qué sirven. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat (Esp) VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica (2017). (101), N° 2 339-417.
- [138] McKee James R.; McKee Trudy. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5 ed. (2014) ISBN: 9786071511270.
- [139] Leal Pérez F. Fisiología Vegetal Parte II. Enzimas y coenzimas, mecanismos de regulación. Metabolismo. Fotosíntesis, Plantas C-3, C-4, CAM, intermedias, fotorespiración, quimiosíntesis. Respiración y fermentación. Metabolismo de hidratos de carbono. Metabolismo de lípidos.

Metabolismo de proteínas. Metabolismo de ácidos nucleicos, expresión genética. Metabolismo secundario. Universidad Nacional de Ucayali. Perú. (2017).

[140] <http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>

[141] López D. Biología acceso a la universidad mayores de 25 años.

[142] González E. Corzo A., Chifarelli V. Guía teórico práctica de problemas y ejercicios de química biológica. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Facultad de Ciencias Forestales. Ingeniero Néstor René Ledesma. Serie didáctica N° 36 (2009).

ISBN: 978-987-1676-50-7.

[143] Cruz Mamani, X.E. Determinación de la acción in vitro del extracto metanólico de cedrón (*Lippia Citriodora*) sobre células de melanoma inhibiendo la melanogénesis y sobre la actividad in vitro de la enzima tirosinasa sobre el sustrato L-Tirosina. Escuela Profesional de Ingeniería biotecnológica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica Santa María. Perú (2017).

[144] Burger P.; Landreau A.; Azoulay S.; Michel T. ; Fernández X. Skin whitening cosmetics : Feedback and challenges in the development of natural skin lighteners. *Cosmetics* (2016) 3(4) 36-60.

[145] Perpiñán Vielba M.F. Bioinorgánica. Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. (2013).

[146] Kaminsky A.; Flórez-White M. Acné. Un enfoque global. Colegio Ibero-Latinoamericano de Dermatología. Grupo Ibero-Latinoamericano de Estudio del Acné. Alfaomega Grupo Editor S.A. ISBN: 978-987-1609-38-3.

[147] Casañola-Martín G.M; Marrero-Ponce Y.; Thi-Thu H.; Khan M.T.H.; Torrens F.; Rescigno A.; Abad C. La enzima tirosinasa: 2 inhibidores de origen natural y sintético. *Afinidad LXX* (2013) 564, 270-276.

[148] García Guerrero M.C. Caracterización estructural y funcional de dos metalo-carboxipeptidasas de la familia M14 con especificidad de sustratos tipo ácido: carboxipeptidasas citosólica 6 y carboxipeptidasa O humanas. Tesis Doctoral Institut de Biotecnologia i Biomedicina Unitat d'Enginyeria de Proteïnes i Proteòmica. Universitat Autònoma de Barcelona (2017).

[149] Cascales Angosto M.; Álvarez-Gómez J.A. Metaloproteínas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm* (2010) 76 (1) 59-84.

- [150] Fierro-Arias L.; Campos-Carnejo N.G.; Contreras-Ruiz J.; Espinosa-Maceda S.; López-Gehrkel I.; Márquez-Cárdenas R.; Ramírez-Padilla M.; Veras-Castillo E.; Rodríguez-Alcocer A.N. Productos enzimáticos (hialuronidasa, collagenasa y lipasa) y su uso en dermatología. *Dermatol Rev. Mex.* (2017) 61(3) 206-2019.
- [151] Torra i Bou J.E.; Paggi B. Collagenase and devitalized tissue in the framework of the wound bed preparation. *Rev ROL Enf* (2013) 36 (2) 109-114.
- [152] De Paz Lugo P. Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivo celulares. Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. (2006).
- [153] Pons L. Metaloproteínas y matriz extraceular dérmica. Aspectos claves de la degradación del tejido conjuntivo dérmico (I). Actualidad científica. *OFFARM* (2004) 23 (5) 147-148.
- [154] Thomas B Fitzpatrick. Lowell A. Goldsmith S.I.; Barbara A. Gilchrest A.S.; Paller D.J.; Leffell K. W. Dermatología en Medicina General. Sección 9 Trastornos de lequipo concetivo de la dermis. Uitto J.; hu M.L.; Gallo R.; Eisen A.Z. Capítulo 61. Colágeno, Fibras elásticas y matriz extracelular de la dermis. (2014). ISBN: 9786079356002.
- [155] Matoses C.; De Miguel E.; Polache J.; Aznar M.T.; Borrás J.; Navarro A. Tratamiento de la contractura de Dupuytren en pacientes adultos que presenten cuerda palpable. Collagenasa (Xiaqpex ®) Agencia Valenciana de la Salud. Conselleria de SANitat. Generalitat Valenciana. (2013).
- [156] Ferranti-Ramos A.; Garza-Garza G.; Bátiz-Armenta J.; Martínez-Delgado G.; De la Garza-Lavarez F.; Martínez-Menchaca H. R.; Rivera-Silva G. Matrix metalloproteinases and their participation in the healing process. *Med.UIS.* (2017), 30 (2) 55-62.
- [157] Yadav R. K.; Gupta S.P.; Sharma P.K.; Patil V.M. Recent advances in studies on hydroxamates as matrix metalloproteinease inhibitors: a review. (2011), 18, 1704-1722. ISSN: 0929-8673.
- [158] Law S.; Du X.; Panwar P.; Honson N. S.; Pfeifer T.; Roberge M.; Bromme D. Indentification of substrate-specific inhibitors of cathepsin K through high-throughput screening. *Biochemical.* (2019), 476, 499-512. ISSN: 0264-6021.
- [159] Sanz L.C; Pérez A.G.; Olías J.M. La lipoxigenasa en el reino vegetal I. Propiedades. Instituto de la Grasa y sus derivados. Sevilla. (1992) Fasc.43, 4, 231-239.
- [160] Sanz L.C; Pérez A.G.; Olías J.M. La lipoxigenasa en el reino vegetal II. Funciones fisiológicas asignadas. Instituto de la Grasa y sus derivados0 (1992) Fasc. 43, 5 287-290.

- [161] Toledo Valdés G. Ensayos de inhibición enzimática de 15-lipoxigenasa de soya por una serie de bencil fenil cetonas polihidroxiladas. (2016) Universidad de Santiago de Chile.
- [162] Mendoza Mena D.L.; Sánchez Catalán K.; Saavedra Ahumada S. Biochemical characterization of (*Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, tenebrionidae) Aqueous extracts: Exploration of dual inhibition of lipoxygenase (15-LOX) and cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). *Biosalud*, (2016) 15, 2, 37-54. ISSN: 1657-9550.
- [163] Pérez Ruiz A.O.; Cartaya Padrón L.; València Fernández V.; Sanjurjo Gámez V.; Ilisástigui Ortuela T. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. Facultad de estomatología Instituto superior de Ciencias Médicas de La Habana. *Rev Cubana Estomatol* (1998) 35, (3) 56-61.
- [164] Alberti J.-C. Etude du mecanisme catalytique de la lipoxygénase 1 d'olive. Thèse doctorale. Université de Corse Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 SPE. (2013)
- [165] Duque Macías A.L. Estudio de las propiedades antioxidantes de flavonoides alimentarios y su efecto sobre la biosíntesis de eicosanoides mediada por lipoxigenasa hepática. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Badajoz. (2011).
- [166] Saderholm M. Biochemistry I (CHM 340) or Foundations of Biochemistry (CHM 345). Biochemistry Protein Projects. Elastase. Berea College. Berea Kentucky. USA. (2010). <http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2009/Marlen/>
- [167] <https://elrinconcicodelaciencia.wordpress.com/category/bioquimica/>
- [168] Goldstein D.J. Biotecnología, universidad y política. Siglo Vintiuno Editores. 1 Ed México (1989) ISBN: 968-23-1530-1.
- [169] Voet; Voet; Pratt. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Editorial Médica Panamericana. 2 Ed. ISBN: 978-950-06-2314-8.
- [170] Paola Giovannoni M.; Schepetkin I.A.; Crocetti L.; Ciciani G.; Cilibrizzi A.; Guerrini G.; Khlebnikov A. I.; Quinn M. T.; Vergelli C. Cinnoline derivatives as human neutrophil elastase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* (2016) 31, 628-639.
- [171] Guija-Poma E.; Inocente-Camones M. A.; Ponce-Prado J.; Zarzosa-Norabuena E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med.* (2015), 15 (1), 57-60.

- [172] Tovar del Río J.; Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Universidad técnica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química. Pereira. Colombia. (2013).
- [173] Carocho M., Ferreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* (2013). 51, 15–25.
- [174] Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C. Free radical Scavenging behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH• System. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2004). 52, 912-915.
- [175] Ramos Llica E.; Castañeda Castañeda B.; Ibáñez Vásquez L.; Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Aced. Perú. Salud* (2018) (15) 1, 42-46.
- [178] Cardoso C.L., Silva H.S, Castro-Gamboa Ian., Bolzani V.S. New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society* (2005). 16, 1353-1359.
- [179] Dorman H.J.D, Hiltunen R. Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*. (2004). 88; 193-199.
- [180] Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*. (2007) 101; 465-470.
- [181] Martínez Vásquez J. B. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca. México. (2007).
- [182] Jiménez Monreal A.M.; Sánchez Manzanera M.; Martínez Tomé M. Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew. *An. Vet.* (2012), 28, 67-78.
- [183] Muñoz Juárez M.A.; Gutiérrez D.M. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétano. México. (2008)

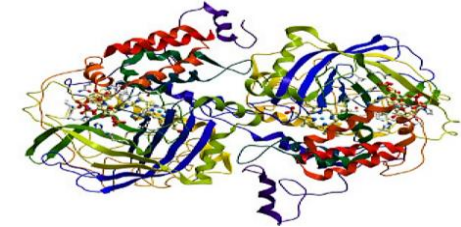
- [184] Ruiz Reyes S.; Venegas Casanova E.; Díaz Solano H.; Rodríguez Quito I. Antioxidant capacity in vitro total isoflavones obtained from seeds of *Glycine max* L. (Soya) from the province of Jaén, Cajamarca. *UCV-Scientia* (2012), 4 (1) 23-32.
- [185] Medoza Pérez J.A.; Fregoso Aguilar T.A. Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico. *IntechOpen*. (2013) Chapter 3. <http://dx.doi.org/10.5772/52247>.
- [186] Ojha H.; Mishra K.; Chaudhury N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. (2012). 130; 1036–1043.
- [187] Kumarappan C.T.; Thialagam E.; Mandal S. Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (2012). 19, 349-355.
- [188] Aquino R.; Morelli S.; Lauro M.R.; Abdo S.; Saija A.; Tomaino A. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J. Nat. Prod.* (2001). 64, 1019-1023.
- [189] Heim K.E.; Tagliaferro A.R.; Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (2002) 13, 572–584.
- [190] Huang D.; Ou B.; Prior R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2005). 53, 1841–1856.
- [191] Crozier A.; Jensen E.; Lean M.; McDonal M. Quantitative analyses of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. (1997). 761, 315-321.
- [192] Andersen Q.M.; Markhan K.R. Flavonoids-chemistry, biochemistry and applications. *Taylor and Francis Group*, Boca raton. (2006).
- [193] Hu, F.; Bian, K.; Liu, Y.; Su, Y.; Zhou, T.; Song, X.; He, L. Development of a modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method for the determination of multi-class antimicrobials in vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2014) 1368, 52–63.
- [194] Hu. X; Zhou Q.; Luo Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*. (2010) 158 (9) 2992-2998.

- [195] Moreno Ramón H.; Ibañez Asensio S. Determinación del nitrógeno total en suelos por Kjeldahl. Universidad Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Agronómica y del Medio Natural. Departamento de producción vegetal (2017).
- [196] Guión de prácticas de laboratorio de Química Analítica I. Departamento de Química Analítica. Facultad de Químicas. Universidad de Sevilla.
- [197] Waters Corporation. Pharmaceutical Solutions. Metabolic Profiling Solutions. (2008).
- [198] Waters Corporation. Product Solution. MetaboLynx Application Manager (2007).
- [199] Stierlin E.; Azoulay S.; Massi L.; Fernández X.; Michel T. Cosmetic potentials of *Prunus domestica* L. leaves. *J. Sci. Food. Agric* (2018), 98, 726-736.
- [200] Sánchez Gallego J.I. Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Salamanca.Tesis Doctoral. Salamanca. (2009).
- [201] Khrenova M.; Kots E.; Varfolomeev S.; Lushchekina S.; Nermukhin A. Three faces of N-acetylglutamate: activator, substrate, and inhibitor of human aspartoacylase. *J. Phys. Chem. B* (2017), 40, 9389-9397.
- [202] Wang; Xiaojun; Kemp; Robert G. Reaction path of phosphofructo-1-kinase is altered by mutagenesis and alternative substrates. *Biochemistry* (2001), 40, 3938-3942.
- [203] Hua L.; Shi-Xiang L.; Zhong, Ye-Jun, Wu, Dan. Effect of luteolin on activity and conformation of tyrosinase. *Journal*, (2014),30, 51-55. ISSN: 1673-9078.
- [204] Herald T.J.; Priyadarshini G.; Tilley M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J. Sci. Food Agric.* (2012) 92, 2326-2331.
- [205] Xu, Haining Zhang, Xiaoming, Karangwa E. Inhibition effects of maillard reaction products derived from L-cysteine and glucose on enzymatic browning catalyzed by mushroom tyrosinase and characterization of active compounds by partial least squares regression analysis. *RSC Advances* (2016), 70, 65825-65836. ISSN: 2046-2069.
- [206] Tanoue, R., Sato, Y.,Motoyama, M., Nakagawa, S., Shinohara, R., Nomiyama, K. Plant uptake of pharmaceutical chemicals detected in recycled organic manure and reclaimed wastewater. *J. Agric. Food Chem.* (2012) 60, 10203–10211.

- [207] Wu, X., Conkle, J.L., Ernst, F., Gan, J., Treated wastewater irrigation: uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* (2014) 48, 11286–11293.
- [208] Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Bruno, A., Bracale, M., Vannini, C. Uptake and effects of amixture of widely used therapeutic drugs in *Eruca sativa* L. and *Zea mays* L. plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2014) 108, 52–57.
- [209] Montemurro, N., Postigo, C., Lonigro, A., Perez, S., Barceló, D. Development and validation of an analytical method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection for the simultaneous determination of 13 relevant wastewaterderived contaminants in lettuce. *Anal. Bioanal. Chem.* (2017) 409, 5375–5387.
- [210] Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C.W., High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of the parent drugs and theirmetabolites in extracts from cress (*Lepidium sativum*) grown hydroponically in water containing four non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Chromatogr. A* (2017) 1491, 137–144.
- [211] Kodesova R., Klement A.; Glolovko O.; Fér M. ; Nikodem A. ; Kocarek M. ; Grabic R. Root uptake of atenolol, sulfamethoxazole and carbamazepine and their transformation in three soils and four plants. *Environ Sci. Pollut Res.* (2019) 26, 9876-9891.
- [212] Ficha técnica: Sustrato universal Batlle.
https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/192544/14_sustratos.pdf
- [213] Ficha técnica: Sustrato fibra de coco block Batlle.
<http://profesional.semillasbatlle.com/es/fibra-de-coco-block>
- [214] Plainfossé H.; Burger P.; Azoulay S.; Landreau A. ; Verger-Doubois G. ; Fernández X. Development of a natural anti-age ingredient based on *Quercus pubescens* Wild. Leaves Extrat-A Case Study. *Cosmetics* (2018), 5, (15), 2-21.
- [215] Chiocchio I.; Mandrone M.; Sanna C.; Maxia A.; Tacchini M.; Poli F. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors two enzymatic tragets of cosmetic interest. *Industrial crops and products* (2018), 122, 498-505.
- [216] Lopez A.; Rodrigues M. J.; Pereira C.; Oliveira M.; Barreira L.; Varela J.; Trampetti F.; Custódio L. Natural products from extreme marine environments: Searching for potential industrial uses within extremophile plants. *Industrial crops and products* (2016) 94, 299-307. ISSN: 0926-6690.

- [217] Florence T.; Gan D.; Hines M. Topical skin care formulations comprising plant extracts. PCT. *Int. Appl.* (2012) Patent. 84.
- [218] Nesseem D.I.; Michel C.G.; Development and characterization of local anti-inflammatory implantation for the controlled release of the hexane extract of the flower-heads of *Euryops pectinatus* L. (Cass.). *Drug discoveries and therapeutics*. (2011), 5 (2), 96-106. ISSN: 1881-7831.
- [219] Park So-Hyun; Lee, Da-Hye; Min Jung; Ahn Jang; Young-Jin Ha; Tae-Youl; Jung Chang. *Inula japonica* Thunb flower ethanol extract improves obesity and exercise endurance in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*. (2019), 11 (1) 17. ISSN: 2072-6643.
- [220] Varnava K.G.; Gabrieli C.; Konstantinidou M.; Kokkalou E. Phytochemical analysis with bioogical activities of *Calendula officinalis* (Asteraceae), growing wild in Mount Athos. *International Journal of Research in Pharmacy and Science* (2016), 6 (2), 9-14. ISSN: 2249-3522.
- [221] Shwu-Woan L. A new lipoxygenase inhibitory flavonoid from the kino of *Eucalyptus citriodora*. *Chemistry of Natural Compounds* (2019), 55(1), 18-20. ISSN: 0009-3130.
- [222] Nacoulma Aminata P.; Compaore M.; De Lorenzi M.; Kiendrebeogo M.; Nacoulma Odile G. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) Leafy galls induced by *Rhodococcus fascians*. *Journal of Phytopathology* (2012), 160, 617-621. ISSN: 1439-0434.
- [223] Helvacı S.; Koekdil G.; Kawai M.; Duran G.; Guevenc A. Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkakengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D. *Pharmaceutial Biology*. (2010), 48, 142-150. ISSN: 1388-0209.
- [224] Khan M.A.; Khan H.; Sarwar; Mahmood T.; Khan P.M.; Jabar A. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Physalis minima* Linn. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. (2009), 24, 632-637. ISSN: 1475-6366.
- [225] Crisan M.; Liminita D.; Moldovan B.; Vulcu A.; Dreve S.; Perde-Schrepler M.; Tatomir C.; Filip A. G.; Bolfa P.; Achim M.; Chiorean I.; Kacso I.; Grosan C.B.; Olenis L. New nanomaterials for the improvement of psoriatic lesions. *Journal of Materials Chemistry B: Materials for Biology and Medicine*. (2013), 1, (25) 3152-3158. ISSN: 2050-7518.
- [226] Olenic L.; Vulcu A.; Chiorean I.; Crisan M.; Berhian-Grosan C.; Dreve S.; David L.; Tudoran L.B.; Kacso I.; Neamtu C.; Voica C. Effect of natural extracts pH on morphological characteristics of hybrid materials based on gold nanoparticles. *AIP Conference Proceedings*. (2013) 1565, 238-242. ISSN: 0094-243X.

- [227] Inomata S. Yokogawa Y.; Tanaka N.; Yagi E.; Sakamoto O. Skin-lightening and antiaging cosmetics containing *Eucalyptus alba* Reinw. extracts.Jpn. Kokai Tokkyo Koho 7 pp. Patent 1997 CODEN:JKXXAF. JP 09087137.
- [228] Rajic A.; Kweifio-Okai G.; Macrides T.; Sandeman R. M.; Chandler D.S.; Polya G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. *Panta Medica*. (2000) 66 (3), 206-210. ISSN: 0032-0943.
- [229] Persson I.A.; Persson K. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) *Recent Progress in Medicinal Plants, conference general review*. (2010) 28, 159-171. ISBN: 0-9656038-5-7.
- [230] Seibu Y.; Wakamatsu K.; Tanaka K.; Tsuda Y. Elastase activity inhibitor or composition/Elastase activity inhibitor comprising herb extract for preventing skin aging, and cosmetic composition containing the same. Patent (2002) Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 27.
- [231] Meihui F., Guowen Z., Xing H., Ximing X., Deming G. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Research International* (2017) 100, 226-233. ISSN: 0963-9969.
- [232] Hsiou-Yu D., Hang-Chang L., Te-Sheng C. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa*. *Journal of Cosmetic Science* (2009) 60, 1525-7886.
- [233] Kubo I., Kinst-Hori I., Chaudhuri S., Kubo Y., Sanchez Y., Ogura T. Flavonols from *Heterotheca inuloides* : Tyrosinase inhibitory activity structural criteria. *Bioorganic & medicinal chemistry*. (2000) 8, 1749-1755. ISSN : 0968-0896.
- [234] Didem S., Suat S., Burak B., Arzu O. Tyrosinase inhibition by some flavonoids : Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry* (2018) 81, 168-174. ISSN : 0045-2068.



ANEXO I

ANNEXE I

En este anexo, se recogen las tablas explicativas de las rutas metabólicas obtenidas a través del software MetaboLynx del procesamiento de las muestras *Juncus sp.*, *Salicornia europaea* y *Lavandula dentata*, con cada uno de los principios activos a los que han sido sometidas las plantas en los ensayos de exposición: CBZ, FMQ, CPR, ENR, IBU y DCL medido en modo positivo y negativo.

A cada metabolito obtenido se le ha asignado un nombre formado por las tres letras del principio activo con el cual ha sido procesado, seguido de la letra de la matriz vegetal sometida al ensayo de exposición y un número, indicando la cantidad de metabolitos adquiridos. Se muestran también las masas teóricas de cada posible metabolito, procedente de las distintas rutas metabólicas, las masas encontradas por el software, el error entre ambas expresado en partes por millón y la formula empírica de cada posible metabolito obtenido.

Dans la présente annexe, les tableaux explicatifs des voies métaboliques obtenues par le logiciel MetaboLynx lors du traitement des échantillons de *Juncus sp.*, *Salicornia europaea* et *Lavandula dentata*, avec chacun des principes actifs auxquels les plantes ont été soumises dans les tests d'exposition: CBZ, FMQ, CPR, ENR, IBU et DCL mesurés de manière positive et négative.

Chaque métabolite obtenu se voit attribuer un nom composé des trois lettres de la matière active avec laquelle il a été traité, suivies de la lettre de la matrice végétale soumise au test d'exposition et d'un chiffre indiquant la quantité de métabolites acquis. Les masses théoriques de chaque métabolite possible, provenant des différentes voies métaboliques, les masses trouvées par le logiciel, l'erreur entre les deux exprimées en parties par million et la formule empirique de chaque métabolite possible obtenu, sont également présentées.

CARBAMAZEPINA-LAVANDULA DENTATA**CARBAMAZÉPINE-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CBZ-L 1	165.0578	166.0642	3.15	-4.8	C ₁₂ H ₇ N	Deethylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-L 2	165.0578	166.0654	11.29	-1.5	C ₁₂ H ₇ N	Deethylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-L 3	207.0684	208.0756	15.43	-3.0	C ₁₄ H ₉ NO	Demethylation-HN (R_0:-HN)
CBZ-L 4	216.0789	217.0851	4.07	-4.7	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-L 5	218.0844	219.0929	4.78	3.2	C ₁₅ H ₁₀ N ₂	Alcohols dehydration
CBZ-L 6	221.0841	222.0937	4.03	5.3	C ₁₅ H ₁₁ NO	Parent-HN (R_0 :-HN)
CBZ-L 7	223.0997	224.1088	9.10	5.2	C ₁₅ H ₁₃ NO	Reduction-HN (R_0:-HN)
CBZ-L 8	225.0790	226.0873	11.24	2.3	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	2 x Hydroxylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-L 9	235.0997	236.1072	12.83	-1.3	C ₁₆ H ₁₃ NO	Acetylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-L 10	239.0946	240.1016	5.84	-3.5	C ₁₅ H ₁₃ NO ₂	Hydration-HN (R_0 :-HN)
CBZ-L 11	244.0738	245.0795	5.08	5.6	C ₁₅ H ₁₁ NNaO	Sodiado-HN (R_0 :-HN)
CBZ-L 12	253.0739	254.0832	7.55	6.0	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	2 x Hydroxylation-HN (R_0 :-HN)
CBZ-L 13	254.1055	255.1140	4.19	2.6	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	Hydration
CBZ-L 14	277.0750	278.0816	14.76	-0.5	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation
CBZ-L 15	278.1055	279.1145	15.43	4.2	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	Acetylation

FLUMEQUINA-LAVANDULA DENTATA**FLUMÉQUINE-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
FMQ-L 1	213.0790	214.0869	5.24	0.6	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	Hydroxymethylene loss-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-L 2	215.0746	216.0838	8.43	6.3	C ₁₃ H ₁₀ FNO	Hydroxymethylene loss-O (R_0 :-O)
FMQ-L 3	215.0746	216.0807	15.23	-8.1	C ₁₃ H ₁₀ FNO	Hydroxymethylene loss-O (R_0 :-O)
FMQ-L 4	225.0790	226.0870	6.75	1.0	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 5	225.0790	226.0865	9.74	-1.2	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 6	225.0790	226.0879	11.25	5.0	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 7	225.0790	226.0858	12.67	-4.3	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 8	229.0739	230.0813	4.49	-1.7	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 9	229.0739	230.0811	7.09	-2.6	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 10	231.0696	232.0786	5.00	5.4	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₂	Hydroxymethylene loss
FMQ-L 11	245.0852	246.0946	3.91	6.5	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	Parent-O (R_0 :-O)
FMQ-L 12	245.1052	246.1147	3.81	7.0	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 13	245.1052	246.1124	8.73	-2.4	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 14	245.1052	246.1125	12.49	-2.0	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 15	247.0645	248.0728	4.15	2.1	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Demethylation
FMQ-L 16	247.1009	248.1077	13.13	-3.9	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
FMQ-L 17	259.0845	260.0938	3.39	6.0	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 18	261.1001	260.0912	6.96	-4.2	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 19	261.1001	262.1071	10.74	-3.1	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 20	261.1001	262.1075	11.07	-1.6	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 21	263.0958	264.1026	3.91	-3.7	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₃	Reduction
FMQ-L 22	266.0793	267.0873	5.32	0.7	C ₁₄ H ₁₃ NNaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 23	268.0750	269.0828	6.29	0.1	C ₁₄ H ₁₂ FNNaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
FMQ-L 24	268.0750	269.0837	9.14	3.4	C ₁₄ H ₁₂ FNNaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
FMQ-L 25	275.0794	276.0878	8.01	2.3	C ₁₄ H ₁₃ NO ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 26	275.0794	276.0876	11.33	1.6	C ₁₄ H ₁₃ NO ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
FMQ-L 27	275.0794	276.0859	12.37	-4.6	C ₁₄ H ₁₃ NO ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-L 28	277.0750	278.0831	8.94	1.0	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation
FMQ-L 29	277.0750	278.0827	11.29	-0.5	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation
FMQ-L 30	277.0750	278.0811	14.42	-6.3	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation
FMQ-L 31	285.1001	286.1082	15.69	1.0	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄	Acetylation-F+H (R_1 :-F+H)

CIPROFLOXACINA-LAVANDULA DENTATA**CIPROFLOXACINE-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-L 1	247.0645	248.0740	4.41	7.0	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Parent-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-L 2	249.0801	250.0860	9.18	-7.7	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-L 3	249.0801	250.0863	11.67	-6.5	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-L 4	263.0706	264.0785	4.62	0.3	C ₁₂ H ₁₀ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 5	275.1070	276.1156	3.19	2.9	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 6	276.0910	277.1002	1.22	5.0	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃	Demethylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 7	276.0910	277.1002	14.34	5.0	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃	Demethylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 8	277.0863	278.0959	11.20	6.6	C ₁₃ H ₁₂ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 9	279.0543	280.0623	8.73	0.7	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₅	2 x Hydroxylation-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-L 10	285.1277	286.1371	1.26	5.5	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0 :-O)
CPR-L 11	285.1277	286.1368	14.92	4.4	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0 :-O)
CPR-L 12	289.0750	290.0815	10.10	-4.6	C ₁₅ H ₁₂ FNO ₄	Acetylation-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-L 13	290.1067	291.1157	11.07	4.2	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 14	291.1019	292.1088	1.22	-3.2	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Parent-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 15	292.1223	293.1319	3.85	6.1	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₃ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 16	292.1223	293.1281	9.10	-6.9	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 17	301.1227	302.1304	1.30	-0.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
CPR-L 18	301.1227	302.1295	3.73	-3.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
CPR-L 19	305.1176	306.1252	11.49	-0.6	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Parent-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 20	306.1016	307.1090	3.31	-1.3	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 21	307.1332	308.1408	7.05	-0.7	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 22	313.1227	314.1325	5.16	6.5	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration
CPR-L 23	313.1426	314.1507	7.77	0.8	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-L 24	314.0917	315.1003	2.95	2.6	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 25	315.1383	316.1465	11.20	1.3	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Parent-O (R_0 :-O)
CPR-L 26	315.1583	316.1674	13.72	4.2	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₃	Reduction-F+H (R_1 :-F+H)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-L 27	317.1540	318.1614	11.99	-1.1	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
CPR-L 28	322.0965	323.1033	11.37	-3.1	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 29	323.1281	324.1342	5.92	-5.4	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 30	323.1281	324.1368	10.56	2.7	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 31	323.1281	324.1374	12.25	4.5	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 32	328.1073	329.1152	10.44	0.2	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-L 33	329.1376	330.1468	10.60	4.4	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-L 34	332.1172	333.1263	4.20	3.8	C ₁₇ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Acetylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-L 35	333.1125	334.1210	3.95	2.1	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 36	333.1125	334.1189	4.78	-4.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 37	333.1125	334.1186	5.62	-5.1	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 38	333.1125	334.1186	5.84	-5.1	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 39	333.1125	334.1208	13.17	1.5	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-L 40	333.1489	334.1567	3.85	0.1	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction
CPR-L 41	336.1324	337.1388	4.88	-4.2	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ NaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-L 42	338.1281	339.1376	4.15	5.1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
CPR-L 43	345.1325	346.1403	5.32	0.1	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-L 44	345.1325	346.1416	10.74	3.9	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-L 45	347.1281	348.1348	3.69	-3.3	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-L 46	347.1281	348.1374	10.70	4.2	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-L 47	347.1281	248.1378	15.14	5.4	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-L 48	355.1532	356.1626	3.15	4.5	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄	Acetylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-L 49	363.1230	364.1315	11.28	1.8	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation

ENROFLOXACINA-LAVANDULA DENTATA**ENROFLOXACINE-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-L 1	146.1055	147.1144	9.02	5.3	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2 x Hydroxylation-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7:-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-L 2	156.1263	157.1335	3.73	-3.6	C ₈ H ₁₆ N ₂ O	Acetylation-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7 :-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-L 3	156.1263	157.1322	10.52	-3.9	C ₈ H ₁₆ N ₂ O	Acetylation-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7 :-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-L 4	217.0539	218.0630	8.81	4.0	C ₁₂ H ₈ FNO ₂	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 5	247.0645	248.0737	4.15	5.8	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Parent-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 6	249.0801	250.0859	11.67	-8.1	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 7	276.0910	277.1002	14.34	5.0	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃	Demethylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-L 8	279.0543	280.0631	8.68	3.6	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₅	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 9	279.0543	280.0624	10.44	1.1	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₅	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 10	289.1227	290.1323	3.23	6.4	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-L 11	289.0750	290.0815	10.10	-4.6	C ₁₅ H ₁₂ FNO ₄	Acethylation-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-L 12	290.1067	291.1158	11.11	4.6	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-L 13	292.1223	293.1300	12.79	-0.4	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-L 14	301.1227	302.1312	5.74	2.5	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration-C ₃ H ₄ (R_4 :-C ₃ H ₄)
ENR-L 15	303.1383	304.1476	4.15	4.9	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 16	305.1176	306.1252	11.49	-0.6	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 17	308.1172	309.1255	14.52	1.5	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 18	311.1634	312.1725	6.12	4.3	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 19	311.1634	312.1698	13.34	-4.4	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 20	313.1227	314.1325	5.16	5.5	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-L 21	313.1590	314.1658	14.72	-3.3	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
ENR-L 22	315.1383	316.1467	11.07	1.9	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Deethylation-O (R_0 :-O)
ENR-L 23	321.1489	322.1587	4.96	6.3	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-L 24	323.1634	324.1694	6.71	-4.5	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂₀	Alcohols dehydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 25	327.1583	328.1671	9.48	3.1	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-L 26	327.1583	328.1668	12.07	2.2	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-L 27	329.1540	330.1603	4.78	-4.4	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-L 28	329.1540	330.1635	9.48	5.3	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
ENR-L 29	331.1332	332.1420	15.48	3.0	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Deethylation
ENR-L 30	333.1489	334.1585	3.85	5.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Parent-C ₂ H ₂ (R_1:-C ₂ H ₂)
ENR-L 31	335.1281	336.1347	5.42	-3.7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-L 32	335.1645	336.1729	11.63	1.7	C ₁₇ H ₂₂ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 33	337.1438	338.1527	3.85	3.3	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-L 34	341.1739	342.1806	9.98	-3.3	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 35	341.1739	342.1802	10.56	-4.5	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 36	343.1696	344.1755	4.82	-5.6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₂	Parent-O (R_0:-O)
ENR-L 37	343.1896	344.1982	14.72	2.4	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	Reduction-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 38	347.1281	348.1358	4.58	-0.4	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-L 39	347.1281	348.1339	14.72	-5.9	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-L 40	349.1438	350.1514	4.11	-0.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-L 41	349.1438	350.1500	13.17	-4.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-L 42	351.1594	352.1654	6.50	-5.2	C ₁₇ H ₂₂ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 43	356.1386	357.1474	8.85	2.7	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 44	357.1689	358.1768	11.67	0.4	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	Hydroxylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 45	359.1845	360.1625	5.32	0.5	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄	Hydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 46	359.1845	360.1943	15.02	5.6	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-L 47	361.1802	362.1898	4.15	5.1	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Reduction
ENR-L 48	361.1802	362.1863	13.59	-4.6	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Reduction
ENR-L 49	364.1637	365.1717	10.06	0.5	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ NaO ₃	Sodiado-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 50	365.1387	366.1458	5.74	-1.9	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 51	365.1387	366.1471	11.20	1.6	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-L 52	366.1594	367.1660	3.81	-3.2	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0:-O)
ENR-L 53	366.1594	367.1691	8.81	5.3	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0:-O)
ENR-L 54	373.1638	374.1712	7.77	-1.0	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 55	377.1751	378.1812	8.43	-4.5	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₄	Hydration
ENR-L 56	383.1845	384.1935	8.45	3.1	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₄	Acetylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-L 57	385.1802	386.1879	14.68	-0.2	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Acetylation-O (R_0:-O)

DICLOFENACO-LAVANDULA DENTATA**DICLOFÉNAC-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL-L 1	106.0419	107.0492	5.42	-4.4	C ₇ H ₆ O	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 2	118.0419	119.0491	1.26	-4.8	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 3	118.0419	117.0324	4.05	-14.1	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 4	121.0528	122.0588	1.10	-14.6	C ₇ H ₇ NO	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 5	122.0368	123.0442	1.26	-3.1	C ₇ H ₆ O ₂	Demethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 6	122.0368	123.0439	5.92	-5.6	C ₇ H ₆ O ₂	Demethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 7	123.0320	124.0393	1.14	-4.3	C ₆ H ₅ NO ₂	Deethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 8	136.0524	135.0430	0.96	-12.0	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 9	136.0524	135.0434	1.22	-9.0	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 10	136.0524	135.0433	2.90	-9.8	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 11	136.0524	135.0433	3.16	-9.8	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 12	136.0524	135.0432	3.32	-10.5	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 13	136.0524	135.0431	4.84	-11.2	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 14	136.0524	137.0599	5.70	-2.4	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 15	136.0524	137.0598	7.35	-3.2	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 16	137.0477	138.0553	1.06	-1.3	C ₇ H ₇ NO ₂	Demethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 17	138.0681	139.0752	12.45	-4.9	C ₈ H ₁₀ O ₂	Reduction-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 18	145.9690	144.9618	10.52	4.1	C ₆ H ₄ Cl ₂	Parent-C ₈ H ₇ NO ₂ (R ₄ :-C ₈ H ₇ NO ₂)
DCL-L 19	151.0633	152.0710	3.15	-0.9	C ₈ H ₉ NO ₂	Parent-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 20	152.0473	153.0549	5.20	-1.6	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 21	152.0473	153.0546	7.77	-3.6	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 22	152.0473	153.0543	15.85	-5.6	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 23	153.0790	154.0866	12.29	-1.2	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Reduction-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 24	154.0630	155.0702	12.67	-3.9	C ₈ H ₁₀ O ₃	Hydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 25	159.0422	160.0507	4.96	4.4	C ₈ H ₈ NaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R ₅ :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-L 26	167.0582	168.0648	5.74	-7.4	C ₈ H ₉ NO ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 27	167.0582	168.0657	8.09	-2.1	C ₈ H ₉ NO ₃	Hydroxylation-C ₅ H ₂ Cl ₂ (R ₃ :-C ₆ H ₂ Cl ₂)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL-L 28	168.0423	167.0336	0.96	-5.1	C ₈ H ₈ O ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCI ₂ (R_5 :-C ₆ H ₃ NCI ₂)
DCL-L 29	168.0423	167.0334	4.39	-6.3	C ₈ H ₈ O ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCI ₂ (R_5 :-C ₆ H ₃ NCI ₂)
DCL-L 30	169.0739	170.0797	5.62	-11.8	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Hydration-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 31	174.0531	173.0446	0.93	-4.0	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 32	174.0531	175.0601	7.05	-4.6	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 33	178.0630	177.0537	3.05	-8.4	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCI ₂ (R_5 :-C ₆ H ₃ NCI ₂)
DCL-L 34	178.0630	179.0702	7.35	-3.3	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCI ₂ (R_5:C ₆ H ₃ NCI ₂)
DCL-L 35	193.0739	192.0645	1.47	-8.3	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 36	193.0739	194.0805	6.51	-6.2	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 37	193.0739	194.0814	15.61	-1.5	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-L 38	243.0451	244.0527	11.91	-0.8	C ₁₄ H ₁₀ ClNO	Alcohols dehydration-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 39	261.0557	260.0497	2.76	7.1	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₂	Parent-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 40	263.0713	264.0785	4.62	-2.3	C ₁₄ H ₁₄ ClNO ₂	Reduction-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 41	277.0061	278.0132	13.42	-2.6	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO	Alcohols dehydration
DCL-L 42	279.0662	280.0756	6.16	5.7	C ₁₄ H ₁₄ ClNO ₃	Hydration-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 43	281.0374	282.0436	6.12	-5.8	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO	Reduction-O (R_0 :-O)
DCL-L 44	281.0010	279.9915	12.54	-6.2	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₂	Demethylation
DCL-L 45	284.0454	285.0538	15.31	2.0	C ₁₄ H ₁₅ ClNNaO ₂	Sodiado-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 46	297.0323	296.0229	15.41	-5.5	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	Reduction
DCL-L 47	303.0662	304.0722	10.70	-6.0	C ₁₆ H ₁₄ ClNO ₃	Acetylation-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-L 48	311.0116	312.0179	11.07	-4.8	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	Hydroxylation
DCL-L 49	313.0272	314.0332	8.05	-5.9	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₃	Hydration
DCL-L 50	313.0272	314.0362	13.42	3.7	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₃	Hydration

IBUPROFENO-LAVANDULA DENTATA**IBUPROFÈNE-LAVANDULA DENTATA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
IBU-L 1	192.1514	191.1426	7.84	-5.3	C ₁₃ H ₂₀ O	Reduction-O (R_0:-O)
IBU-L 2	208.1463	207.1370	2.55	-5.4	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	Reduction
IBU-L 3	208.1463	207.1379	8.95	-3.0	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	Reduction
IBU-L 4	222.1256	221.1167	1.67	-4.9	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Hydroxylation
IBU-L 5	222.1256	221.1168	3.43	-4.5	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Hydroxylation
IBU-L 6	224.1412	223.1322	4.17	-4.2	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Hydration
IBU-L 7	238.1205	237.1114	3.50	-5.5	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	2 x Hydroxylation
IBU-L 8	238.1205	237.1140	6.92	5.4	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	2 x Hydroxylation
IBU-L-9	248.1412	247.1319	6.19	-5.2	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	Acetylation

CARBAMAZEPINA-JUNCUS SP.**CARBAMAZÉPINE-JUNCUS SP.**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse théorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CBZ-J 1	179.0735	180.0806	6.5	-3.3	C ₁₃ H ₉ N	Demethylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-J 2	179.0735	180.0812	11.16	-0.6	C ₁₃ H ₉ N	Demethylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 3	179.0735	180.0803	7.85	-5.6	C ₁₃ H ₉ N	Demethylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 4	191.0735	192.0812	11.87	-1	C ₁₄ H ₉ N	Hydroxymethylene loss-HN (R_0 :-HN)
CBZ-J 5	191.0735	192.0232	14.68	-8.9	C ₁₄ H ₉ N	Parent-CHNO (R_1 :-HN)
CBZ-J 6	193.0891	194.0962	13.33	-3.9	C ₁₄ H ₁₁ N	Parent-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 7	195.1048	196.1121	3.85	-2.6	C ₁₄ H ₁₃ N	Reduction-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 8	195.1048	196.1138	14	6.2	C ₁₄ H ₁₃ N	Reduction-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 9	203.0735	204.0814	15.52	0.5	C ₁₅ H ₉ N	Alcohols dehydration-HN (R_0 :-CHNO)
CBZ-J 10	206.0844	207.0913	13.5	-4.4	C ₁₄ H ₁₀ N ₂	Hydroxymethylene loss
CBZ-J 11	207.0684	208.0754	12.1	-2.9	C ₁₄ H ₉ NO	Demethylation-HN (R_0 :-HN)
CBZ-J 12	208.0637	209.0698	4.53	-8	C ₁₃ H ₈ N ₂ O	Deethylation
CBZ-J 13	209.0841	210.0908	7.81	-5.1	C ₁₄ H ₁₁ NO	Hydroxylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 14	211.0997	212.1066	11.29	-4.3	C ₁₄ H ₁₃ NO	Hydration-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 15	216.0789	217.0877	4.45	4.5	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 16	216.0789	217.0751	9.9	3.6	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 17	216.0789	217.0865	15.73	4.5	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-J 18	218.0844	219.0921	10.4	-6.9	C ₁₅ H ₁₀ N ₂	Alcohols dehydration
CBZ-J 19	218.0844	219.0921	13.13	-0.5	C ₁₅ H ₁₀ N ₂	Alcohols dehydration
CBZ-J 20	221.0841	222.0941	11.99	-2.1	C ₁₅ H ₁₁ NO	Parent-HN (R_0 :-HN)
CBZ-J 21	222.0793	223.0880	14.8	4	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O	Demethylation
CBZ-J 22	223.0997	224.1061	0.76	-6.3	C ₁₅ H ₁₃ NO	Reduction-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 23	223.0997	224.1062	12.33	-5.9	C ₁₅ H ₁₃ NO	Reduction-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 24	225.0857	226.0857	2.18	-4.8	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	2 x Hydroxylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-J 25	225.0790	226.0857	11.71	-4.8	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	2 x Hydroxylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-J 26	235.0997	236.1081	8.05	-2.6	C ₁₆ H ₁₃ NO	Acetylation-CHNO (R_1:-CHNO)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse théorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CBZ-J 27	236.0946	264.1028	11.28	2.6	C ₁₇ H ₁₃ NO ₂	Acetylation-CHNO (R_1:-CHNO)
CBZ-J 28	237.0790	238.0859	2.18	-3.7	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	Hydroxylation-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 29	238.1106	239.1193	9.32	3.7	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O	Reduction
CBZ-J 30	238.1106	239.1186	14.18	-4.7	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O	Reduction
CBZ-J 31	239.0946	240.1042	10.6	5	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂	Hydroxylation-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 32	239.0946	240.1008	13.52	-7.6	C ₁₅ H ₁₃ NO ₂	Hydroxylation-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 33	244.0738	245.0831	14.25	5.6	C ₁₅ H ₁₁ NNaO	Sodiado-HN (R_0:-HN)
CBZ-J 34	252.0899	253.0971	7.75	-2.3	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	Hydroxylation
CBZ-J 35	252.0899	253.0982	13.5	-3.5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	Hydroxylation
CBZ-J 36	254.1055	255.1131	5.46	1.5	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	Hydration
CBZ-J 37	254.1055	255.1147	12.67	-6	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	Hydration
CBZ-J 38	263.0946	264.1027	7.81	1	C ₁₇ H ₁₃ NO ₂	Acetylation-HN (R_0 :-HN)
CBZ-J 39	268.0848	269.0924	1.68	-0.7	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	2 x Hydroxylation
CBZ-J 40	278.1055	279.1133	12.75	-1.9	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	Acetylation
CBZ-J 41	278.1055	279.1123	15.35	-0.8	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	Acetylation

FLUMEQUINA-*JUNCUS* SP.**FLUMÉQUINE-*JUNCUS* SP.**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
FMQ-J 1	213.0790	214.0887	8.73	5	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	Hydroxymethylene loss-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 2	215.0582	216.0675	12.83	5.8	C ₁₂ H ₉ NO ₃	Deethylation-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 3	215.0746	216.0836	12.87	5.4	C ₁₃ H ₁₀ FNO	Hydroxymethylene loss-O (R_0 :-O)
FMQ-J 4	217.0539	218.0625	11.02	3.7	C ₁₂ H ₈ FNO ₂	Deethylation-O (R_0 :-O)
FMQ-J 5	225.0791	226.0857	2.18	-4.8	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 6	225.0791	226.0861	9.2	-3	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 7	227.0746	228.0843	3.15	6.2	C ₁₄ H ₁₀ FNO	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)
FMQ-J 8	227.0746	228.0814	15.22	-4.6	C ₁₄ H ₁₀ FNO	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)
FMQ-J 9	229.0739	230.0818	15.39	0.5	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 10	231.0696	232.0768	15.14	-2.7	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₂	Hydroxymethylene loss
FMQ-J 11	233.0488	234.0551	15.18	-6.5	C ₁₂ H ₈ FNO ₃	Deethylation
FMQ-J 12	239.0700	294.0767	0.84	-3.6	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₅	2 x Hydroxylation
FMQ-J 13	243.0895	244.0953	2.18	2.2	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 14	243.0895	244.0975	5.74	0.6	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 15	245.1052	246.1149	2.81	5.8	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 16	245.0852	246.0943	3.73	4.3	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	Parent-O (R_0:-O)
FMQ-J 17	245.0852	246.0925	11.79	-2.1	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	Parent-O (R_0 :-O)
FMQ-J 18	245.1052	246.1135	15.43	2.1	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 19	247.1009	248.1089	13.17	1	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
FMQ-J 20	259.0845	260.0942	0.92	6.5	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Hydroxylation-F+H (R_1:-F+H)
FMQ-J 21	259.0845	260.0913	5.5	-3.7	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 22	259.0845	260.0940	13.68	6.7	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :--F+H)
FMQ-J 23	261.1001	262.1071	4.45	-3.1	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 24	261.1001	262.1089	14.6	3.8	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 25	263.0958	264.1050	2.57	5.4	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₃	Reduction
FMQ-J 26	266.0793	267.0868	6.04	-1.2	C ₁₄ H ₁₃ NNaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-J 27	268.0750	269.0812	9.1	-5.9	C ₁₄ H ₁₂ FNNaO ₂	Sodiado-O (R_0:-O)
FMQ-J 28	277.0751	278.0816	1.02	-4.5	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
FMQ-J 29	277.0750	278.0825	7.35	-1.2	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation
FMQ-J 30	279.0907	280.0981	1.38	-1.4	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₄	Hydration
FMQ-J 31	279.0907	280.0979	6.55	-2.8	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₄	Hydration
FMQ-J 32	279.0907	280.0997	8.27	4.3	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₄	Hydration
FMQ-J 33	279.0907	280.0907	12.39	-5.3	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₄	Hydration
FMQ-J 34	285.1001	286.1074	7.81	-1.8	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄	Acetylation-F+H (R ₁ :-F+H)
FMQ-J 35	287.0958	288.1054	4.45	5.4	C ₁₆ H ₁₄ FNO ₃	Acetylation-O (R ₀ :-O)
FMQ-J 36	287.0958	288.1051	8.51	5.3	C ₁₆ H ₁₄ FNO ₃	Acetylation-O (R ₀ :-O)
FMQ-J 37	293.0701	294.0770	0.84	-2.6	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₅	2 x Hydroxylation
FMQ-J 38	293.0700	294.0771	7.01	-2.2	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₅	2 x Hydroxylation
FMQ-J 39	303.0907	304.1002	8.35	5.4	C ₁₆ H ₁₄ FNO ₄	Acetylation

CIPROFLOXACINA-JUNCUS SP.**CIPROFLOXACINE-JUNCUS SP.**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-J 1	217.0539	218.0625	11.02	3.7	C ₁₂ H ₈ FNO ₂	Hydroxymethylene loss-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5:-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 2	229.0539	230.0629	3.61	5.2	C ₁₃ H ₈ FNO ₂	Alcohols dehydration-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 3	233.0488	234.0551	15.18	-6.5	C ₁₂ H ₈ FNO ₃	Demethylation-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 4	247.0645	248.0731	9.56	3.4	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Parent-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 5	249.0801	250.0863	9.10	-6.5	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 6	261.0914	262.0995	14.56	1.3	C ₁₃ H ₁₂ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 7	262.0754	263.0836	3.61	1.6	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 8	262.0754	263.0828	7.55	-1.4	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 9	263.0706	264.0773	2.22	-4.3	C ₁₂ H ₁₀ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 10	263.0706	264.0779	6.59	-2.0	C ₁₂ H ₁₀ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 11	270.0542	271.0609	9.48	-4.2	C ₁₃ H ₁₀ FNNaO ₃	Sodiado-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 12	272.0961	273.1046	3.69	2.6	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Alcohols dehydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 13	272.0961	273.1033	15.06	-2.2	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O	Alcohols dehydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 14	275.1070	276.1167	4.45	6.9	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 15	277.0863	278.0932	8.98	-3.1	C ₁₃ H ₁₂ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 16	279.0543	280.0637	10.40	5.1	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₅	2 x Hydroxylation-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-J 17	285.1277	286.1360	3.95	1.6	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
CPR-J 18	285.1277	286.1345	7.89	-3.6	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
CPR-J 19	285.1277	286.1336	13.80	-6.8	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
CPR-J 20	285.1113	286.1182	13.80	-3.3	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₃	Deethylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 21	287.1070	288.1136	8.55	-4.2	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₂	Deethylation-O (R_0:-O)
CPR-J 22	290.1067	291.1138	3.49	-2.3	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₂ H ₃ N (R_4:-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 23	290.1067	291.1127	8.81	-6.1	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₂ H ₃ N (R_4:-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 24	291.1019	292.1082	9.60	-5.2	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Parent-C ₃ H ₄ (R_3:-C ₃ H ₄)
CPR-J 25	293.1176	294.1250	15.22	-1.3	C ₁₄ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 26	295.1321	296.1409	5.08	3.5	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 27	295.1321	296.1385	12.71	-4.7	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 28	297.1277	298.1350	15.35	-1.8	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-J 29	299.1270	300.1344	5.88	-1.3	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 30	299.1270	300.1343	11.87	-1.6	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 31	301.1227	302.1292	6.93	-4.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
CPR-J 32	306.1016	307.1109	3.57	4.9	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R ₄ :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 33	307.0968	308.1053	2.18	2.2	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 34	307.0968	308.1048	9.10	0.5	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 35	307.1332	308.1416	3.53	1.9	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 36	308.1172	309.1234	7.01	-5.3	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 37	308.1172	309.1260	14.42	3.1	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 38	313.0964	314.1029	1.22	-4.3	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 39	313.0964	314.1061	6.08	5.9	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 40	313.1462	314.1523	11.07	5.2	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 41	313.1227	314.1302	11.41	-0.8	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration
CPR-J 42	314.0917	315.1000	5.46	1.6	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 43	315.1383	316.1449	11.32	-3.8	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Parent-O (R_0 :-O)
CPR-J 44	317.1540	318.1631	3.69	4.2	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
CPR-J 45	317.1540	318.1616	14.84	-0.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
CPR-J 46	321.1125	322.1206	3.53	1	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 47	321.1125	322.1212	11.45	2.9	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 48	322.0965	323.1048	1.56	1.6	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 49	322.0965	323.1024	6.24	-5.9	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 50	322.0965	323.1039	11.53	-1.2	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 51	323.1281	324.1364	4.28	1.4	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 52	328.1073	329.1136	6.46	-4.7	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-J 53	329.1376	330.1439	13.13	-4.4	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 54	331.1532	332.1621	5.50	3.3	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₄	Hydration-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 55	332.1172	333.1266	4.96	4.7	C ₁₇ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Acetylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 56	332.0965	323.1030	11.53	-4	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-J 57	333.1125	334.1211	6.97	2.4	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 58	333.1125	334.1189	11.63	-4.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-J 59	333.1489	334.1583	7.59	4.9	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction
CPR-J 60	336.1324	337.1403	3.61	0.3	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ NaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-J 61	336.1324	337.1405	11.91	0.9	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ NaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 62	337.1074	338.1152	7.85	5.85	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
CPR-J 63	338.1281	339.1379	6.03	5	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
CPR-J 64	338.1281	339.1366	13.76	2.1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
CPR-J 65	345.1325	346.1392	8.81	-3.1	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 66	345.1325	346.1408	12.03	1.5	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 67	347.1281	348.1367	4.45	2.2	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-J 68	347.1281	348.1342	10.36	-5.0	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
CPR-J 69	349.1438	350.1519	4.49	0.9	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Hydration
CPR-J 70	355.1532	356.1606	7.85	4.5	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄	Acetylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 71	355.1532	356.1598	13.96	-3.4	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄	Acetylation-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-J 72	357.1489	358.1570	3.99	0.9	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Acetylation-O (R_0 :-O)
CPR-J 73	357.1489	358.1575	10.36	2.3	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Acetylation-O (R_0 :-O)
CPR-J 74	373.1438	374.1532	4.82	2.2	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation
CPR-J 75	373.1438	374.1514	8.39	-0.5	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation
CPR-J 76	373.1438	374.1510	13.42	-1.6	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation

ENROFLOXACINA-*JUNCUS SP.***ENROFLOXACINE-*JUNCUS SP.***

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-J 1	73.0891	74.0964	12.91	-8.0	C ₄ H ₁₁ N	Parent-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8:-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F)
ENR-J 2	75.1048	76.1120	5.84	-5.2	C ₄ H ₁₃ N	Reduction-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8:-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F)
ENR-J 3	105.0790	106.0856	13.04	-4.8	C ₄ H ₁₁ NO ₂	2 x Hydroxylation-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8:-C ₁₅ H ₁₁ N ₂)
ENR-J 4	115.0997	116.1068	6.16	-5.4	C ₆ H ₁₃ NO	Acetylation-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8:-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F)
ENR-J 5	116.1313	117.1372	13.17	-5.8	C ₆ H ₁₆ N ₂	Reduction-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7:-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-J 6	156.1263	157.1355	8.81	5.2	C ₈ H ₁₆ N ₂ O	Acetylation-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7:-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-J 7	217.0539	218.0601	11.07	-7.4	C ₁₂ H ₈ FNO ₂	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-J 8	229.0539	230.0598	7.55	-5.8	C ₁₃ H ₈ FNO ₂	Alcohols dehydration-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-J 9	233.0488	234.0551	15.13	-5.5	C ₁₂ H ₈ FNO ₃	Demethylation-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-J 10	247.0645	248.0726	9.52	1.3	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Parent-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6 :-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-J 11	249.0801	250.0891	10.82	4.3	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-J 12	260.0961	261.1031	7.47	-3.1	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 13	262.0754	263.0823	5.57	-3.3	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₃	Deethylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 14	272.0961	273.1057	5.16	5.6	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Alcohols dehydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 15	272.0961	273.1021	15.06	-5.4	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Alcohols dehydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 16	276.0911	277.0987	1.1	-0.4	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃	Demethylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 17	276.0910	277.0983	7.81	-1.9	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₃	Demethylation-C ₄ H ₇ N (R_5 :-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 18	292.1223	293.1296	11.99	-1.8	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 19	301.1227	302.1292	6.93	-6.0	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 20	303.1383	304.1475	3.69	4.1	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 21	306.1016	307.1113	5.92	5.3	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Hydroxylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 22	308.1172	309.1238	7.97	-4.0	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 23	308.1172	309.1253	14.52	0.9	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 24	331.1332	332.1423	3.19	3.9	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Deethylation

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-J 25	311.1634	312.1728	3.69	5.2	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 26	313.1590	314.1681	4.62	4.0	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
ENR-J 27	313.1227	314.1302	10.10	-0.8	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-J 28	313.0964	314.1050	15.65	2.4	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ NaO ₃	Sodiado-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 29	315.1383	316.1442	9.47	-4.9	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Deethylation-O (R_0:-O)
ENR-J 30	319.1332	320.1408	4.41	-0.7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Parent-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 31	319.1332	320.393	15.18	-5.4	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Parent-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 32	321.1489	322.1582	6.24	4.8	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 33	321.1489	322.1552	14.80	-4.6	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 34	322.0965	323.1047	11.83	1.2	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 35	323.1634	324.1721	12.67	2.9	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄	Alcohols dehydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 36	325.1590	326.1685	4.88	5.1	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O	Alcohols dehydration-O (R_0:-O)
ENR-J 37	325.1590	326.166	8.37	-0.7	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Alcohols dehydration-O (R_0:-O)
ENR-J 38	327.1583	328.1642	4.49	-5.1	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 39	327.1583	328.1677	11.57	4.9	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₃	Demethylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 40	329.1540	330.1609	14.22	-2.6	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
ENR-J 41	331.1332	332.1409	4.32	-0.4	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Deethylation
ENR-J 42	332.1172	333.1252	6.79	0.5	C ₁₇ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Acetylation-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-J 43	333.1489	334.1555	7.59	-3.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Parent-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 44	333.1489	334.1550	15.39	-5.0	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Parent-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 45	335.1645	336.1725	3.23	0.5	C ₁₇ H ₂₂ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 46	335.1645	336.1722	15.43	-0.4	C ₁₇ H ₂₂ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 47	335.1281	336.1363	7.55	1.1	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 48	341.1739	342.1824	4.50	1.9	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 49	341.1540	342.1613	8.05	-1.3	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration
ENR-J 50	341.1739	342.1822	14.10	1.3	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃	Parent-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 51	342.1230	343.1322	1.26	4.1	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 52	342.1230	343.1306	6.55	-0.6	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-J 53	343.1896	344.1958	4.19	-4.6	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	Reduction-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 54	343.1696	344.1783	5.53	2.6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₂	Parent-O (R_0:-O)
ENR-J 55	343.1896	344.1978	10.20	1.2	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	Reduction-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 56	345.1853	346.1911	6.04	-5.2	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₂	Reduction-O (R_0:-O)
ENR-J 57	345.1489	349.1555	7.81	-3.4	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Demethylation
ENR-J 58	347.1281	348.1368	12.87	2.5	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-J 59	349.1438	350.1535	1.26	5.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-J 60	351.1230	3525.1317	10.52	2.4	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 61	354.1230	355.1300	8.01	-2.2	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-J 62	356.1386	357.1478	1.26	3.8	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 63	356.1386	357.1466	9.77	0.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 64	356.1386	357.1482	7.81	4.9	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ NaO ₃	Demethylation
ENR-J 65	357.1689	358.1751	12.91	-4.4	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	Hydroxylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 66	359.1845	360.1918	9.32	-1.4	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄	Hydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 67	361.1438	362.1532	4.03	4.5	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-J 68	361.1802	362.1876	7.85	-1.0	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Reduction
ENR-J 69	363.1230	364.1295	12.83	-3.7	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₄ (R_3_-C ₂ H ₄)
ENR-J 70	364.1637	365.1696	10.74	-4.4	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ NaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-J 71	365.1387	366.1462	3.49	-0.8	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 72	365.1387	366.1485	12.67	5.5	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-J 73	366.1594	367.1656	3.23	-4.3	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0:-O)
ENR-J 74	366.1594	367.1676	12.41	1.2	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0:-O)
ENR-J 75	373.1438	374.1506	8.21	-2.6	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-J 76	373.1638	374.1699	11.03	-4.5	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1:-F+H)
ENR-J 77	375.1594	376.1662	5.88	-2.8	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₄	Hydroxylation
ENR-J 78	377.1751	378.1841	4.28	3.2	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₄	Hydration
ENR-J 79	383.1845	384.1912	7.38	-2.9	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₄	Acetylation-F+H (R_1:-F+H)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-J 80	385.1802	386.1880	4.49	0.1	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Acetylation-O (R ₀ :-O)
ENR-J 81	385.1802	386.1862	13.50	-4.6	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Acetylation-O (R ₀ :-O)
ENR-J 82	391.1543	392.1606	4.53	-4.2	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation
ENR-J 83	391.1543	392.1619	14.06	-0.6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation
ENR-J 84	401.1751	402.1815	4.53	-3.5	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₄	Acetylation

DICLOFENACO-JUNCUS SP.**DICLOFÉNAC-JUNCUS SP.**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL- J 1	106.0419	107.0488	8.31	-8.2	C ₇ H ₆ O	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL- J 2	108.0211	109.0276	3.57	-4.3	C ₆ H ₄ O ₂	Deethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL- J 3	118.0419	119.0494	5.92	-2.2	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL- J 4	121.0528	122.0598	11.03	-6.3	C ₇ H ₇ NO	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL- J 5	122.0368	123.0436	1.26	-1.5	C ₇ H ₆ O ₂	Demethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 6	136.0524	135.0445	4.84	-1.0	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 7	136.0524	135.0435	5.37	-8.3	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 8	137.0477	136.0398	5.15	-0.6	C ₇ H ₇ NO ₂	Demethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL- J 9	137.0477	138.0551	4.35	-2.8	C ₇ H ₇ NO ₂	Demethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 10	151.0633	152.0706	2.57	-3.5	C ₈ H ₉ NO ₂	Parent-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 11	152.0473	151.0377	6.33	-12.1	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5 :-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL- J 12	153.0790	154.0863	4.15	-3.1	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Reduction-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 13	154.0630	153.0545	3.43	-4.5	C ₈ H ₁₀ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 14	154.0630	155.0711	4.78	2.1	C ₈ H ₁₀ O ₃	Hydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_3:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 15	160.9799	161.9884	12.33	4.3	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	Parent-C ₈ H ₆ O ₂ (R_2 :-C ₈ H ₆ O ₂)
DCL-J 16	167.0582	168.0656	3.65	-2.7	C ₈ H ₉ NO ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 17	168.0423	169.0499	4.57	-0.9	C ₈ H ₈ O ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 18	169.0739	170.0824	10.28	4.2	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Hydration-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 19	174.0531	173.0442	3.56	-5.3	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 20	174.0531	173.0444	2.04	-5.2	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 21	174.0531	173.0436	7.15	-9.8	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 22	174.0531	173.0440	7.73	-7.5	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 23	178.0630	177.0547	7.60	-2.8	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5 :-C ₆ H ₃ NCl ₂)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL-J 24	178.0630	177.0549	9.19	-1.7	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-J 25	183.0532	182.0445	3.64	-4.7	C ₈ H ₉ NO ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 26	193.0739	194.0812	3.27	-2.6	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 27	193.0739	192.0657	6.22	-2.0	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-J 28	202.9905	203.9967	11.29	-7.7	C ₈ H ₇ Cl ₂ NO	Acetylation-C ₈ H ₆ O ₂ (R_2:-C ₈ H ₆ O ₂)
DCL-J 29	231.0451	230.0364	12.35	-3.9	C ₁₃ H ₁₀ ClNO	Hydroxymethylene loss-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-J 30	233.0244	234.0322	15.18	0.2	C ₁₂ H ₈ ClNO ₂	Deethylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 31	243.0451	244.0526	1.06	-1.2	C ₁₄ H ₁₀ ClNO	Alcohols dehydration-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 32	247.0401	248.0484	12.03	2.4	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₂	Demethylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 33	249.0112	250.0171	7.93	6.8	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ N	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
DCL-J 34	261.0557	260.0464	12.79	-5.6	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₂	Parent-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 35	263.0713	262.0621	11.80	-5.3	C ₁₄ H ₁₄ ClNO ₂	Reduction-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 36	266.9854	267.9920	13.68	-4.4	C ₁₂ H ₇ Cl ₂ NO ₂	Deethylation
DCL- J 37	277.0061	278.0143	10.06	1.4	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO	Alcohols dehydration
DCL-J 38	277.0506	276.0408	12.41	-7.1	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₃	Hydroxylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 39	279.0218	280.0301	8.05	1.5	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO	Parent-O (R_0:-O)
DCL-J 40	279.0662	280.0749	10.40	3.1	C ₁₄ H ₁₄ ClNO ₃	Hydration-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 41	281.0374	282.0446	9.40	-2.2	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO	Reduction-O (R_0:-O)
DCL-J 42	281.0011	282.0088	12.53	-0.1	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₂	Demethylation
DCL-J 43	281.0374	280.0279	9.40	-6.1	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO	Reduction-O (R_0:-O)
DCL-J 44	293.0445	292.0396	14.54	6.5	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₄	2 x Hydroxylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-J 45	311.0116	312.0199	11.07	1.6	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	Hydroxylation
DCL-J 46	321.0323	320.0246	13.50	0.2	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂	Acetylation-O (R_0:-O)

IBUPROFENO-*JUNCUS SP.***IBUPROFÈNE-*JUNCUS SP.***

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Route
IBU-J 1	176.1201	175.1113	10.57	-5.8	C ₁₂ H ₁₆ O	Hydroxymethylene loss
IBU-J 2	192.1150	191.1070	8.64	-4.9	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	Demethylation
IBU-J 3	222.1256	221.1168	6.78	-4.5	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Hydroxylation
IBU-J 4	222.1256	221.1181	8.27	1.4	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Hydroxylation
IBU-J 5	283.1205	237.1143	13.42	4.7	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	2 x Hydroxylation

CARBAMAZEPINA- SALICORNIA EUROPAEA**CARBAMAZÉPINE- SALICORNIA EUROPAEA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CBZ-S 1	179.0735	180.0821	7.81	4.5	C ₁₃ H ₉ N	Demethylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 2	191.0735	192.0826	14.56	4.8	C ₁₄ H ₉ N	Hydroxymethylene loss (R_0 :-HN)
CBZ-S 3	193.0891	194.0978	4.54	4.4	C ₁₄ H ₁₁ N	Parent-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 4	195.1048	196.1124	5.54	-5.0	C ₁₄ H ₁₁ N	Parent-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 5	203.0735	204.0831	3.23	4.9	C ₁₅ H ₉ N	Alcohols dehydration-HN (R_0 :-HN)
CBZ-S 6	209.0841	210.0902	7.81	4.3	C ₁₄ H ₁₁ NO	Hydroxylation-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 7	216.0789	217.0849	6.89	4.5	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 8	216.0789	217.0850	11.57	-5.2	C ₁₄ H ₁₁ NNa	Sodiado-CHNO (R_1 :-CHNO)
CBZ-S 9	221.0841	222.0913	9.70	-2.6	C ₁₅ H ₁₁ NO	Parent-HN (R_0 :-HN)
CBZ-S 10	223.0997	224.1063	5.92	-5.4	C ₁₅ H ₁₃ NO	Reduction-HN (R_0 :-HN)
CBZ-S 11	239.0946	240.1012	4.62	-5.1	C ₁₅ H ₁₃ NO ₂	Hydration-HN (R_0 :-HN)
CBZ-S 12	252.0899	253.0996	6.01	5.6	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	Hydroxylation
CBZ-S 13	254.1055	255.1136	7.21	1.1	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	Hydration
CBZ-S 14	263.0964	264.1031	4.49	2.6	C ₁₇ H ₁₃ NO ₂	Acetylation-HN (R_0 :-HN)
CBZ-S 15	278.1055	279.1150	5.70	5	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	Acetylation

FLUMEQUINA- SALICORNIA EUROPAEA**FLUMÉQUINE- SALICORNIA EUROPAEA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
FMQ-S 1	215.0582	216.0678	13.34	5.2	C ₁₂ H ₉ NO ₃	Deethylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 2	225.0790	226.0874	12.13	2.8	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 3	227.0746	228.0832	8.56	3.3	C ₁₄ H ₁₀ FNO	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)
FMQ-S 4	231.0696	232.0757	15.48	-7.2	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₂	Hydroxymethylene loss
FMQ-S 5	243.0895	244.0963	5.16	-6.3	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 6	243.0895	244.0969	9.64	-1.8	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	Parent-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 7	245.1052	246.1129	8.35	-0.4	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃	Reduction-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 8	247.1009	248.1106	5.32	7.9	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₂	Reduction-O (R_0 :-O)
FMQ-S 9	247.0645	248.0733	14.76	4.2	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Demethylation
FMQ-S 10	259.0845	260.0911	5.70	-4.5	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 11	261.1001	262.1091	5.58	4.6	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	Hydration-F +H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 12	263.0958	264.1045	4.49	-3.7	C ₁₄ H ₁₄ FNO ₃	Reduction
FMQ-S 13	268.0750	269.0839	5.58	4.2	C ₁₄ H ₁₂ FNNaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
FMQ-S 14	266.0793	267.0851	7.13	-7.6	C ₁₄ H ₁₃ NNaO ₃	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
FMQ-S 15	277.0750	278.0827	7.43	-0.5	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₄	Hydroxylation

CIPROFLOXACINA- SALICORNIA EUROPAEA**CIPROFLOXACINE- SALICORNIA EUROPAEA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-S 1	109.0742	110.0822	0.76	2.1	C ₄ H ₁₀ N ₂ Na	Sodiado-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_6:-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
CPR-S 2	217.0539	218.0605	5.38	-5.6	C ₁₂ H ₈ FNO ₂	Hydroxymethylene loss-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-S 3	262.0754	263.0832	12.41	0.1	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₃ N (R_4:-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 4	270.0542	271.0622	7.93	0.6	C ₁₃ H ₁₀ FNNaO ₃	Sodiado-C ₄ H ₈ N ₂ (R_5 :-C ₄ H ₈ N ₂)
CPR-S 5	272.0961	273.1022	15.10	-6.3	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Alcohols dehydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 6	275.1070	276.1136	2.95	-4.4	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-S 7	285.1277	286.1346	7.93	-3.3	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
CPR-S 8	290.1067	291.1129	7.47	-5.4	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₂ H ₃ N (R_4:-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 9	290.1067	291.1133	10.06	-4.0	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₂ H ₃ N (R_4:-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 10	291.1019	292.1108	5.42	3.7	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Parent-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-S 11	292.1223	293.1304	12.41	1.0	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 12	293.1176	2914.127	2.95	5.6	C ₁₄ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-S 13	294.1277	298.1375	2.73	5.6	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)
CPR-S 14	297.1277	298.1364	2.77	2.9	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O	Alcohols dehydration-C (R_0 :-O)
CPR-S 15	303.1019	304.1107	3.65	3.2	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Deethylation
CPR-S 16	306.1016	307.1098	7.43	1.4	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 17	308.1172	309.1255	9.21	1.5	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 18	309.1125	310.1204	5.74	0.4	C ₁₄ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-S 19	313.1227	314.1296	7.67	-2.7	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration
CPR-S 20	314.0917	315.0994	8.94	-0.3	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)
CPR-S 21	317.1176	318.1246	7.31	-2.4	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Demethylation
CPR-S 22	317.1176	318.1250	10.08	-1.2	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Demethylation
CPR-S 23	323.1281	324.1343	7.25	-5.1	C ₁₅ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydration-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
CPR-S 24	328.1073	329.1140	10.86	-3.5	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
CPR-S 25	332.1172	333.1234	8.98	-4.9	C ₁₇ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Acetylation-C ₂ H ₃ N (R_4 :-C ₂ H ₃ N)
CPR-S 26	333.1489	334.1587	4.28	5.1	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction
CPR-S 27	333.1489	334.1573	12.41	1.9	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction
CPR-S 28	333.1125	334.1191	9.14	-3.6	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_3 :-C ₃ H ₄)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
CPR-S 29	336.1324	337.1408	3.61	1.8	$C_{17}H_{19}N_3NaO_3$	Sodiado-F+H (R_1 :-F+H)
CPR-S 30	337.1074	338.1170	2.95	5.3	$C_{15}H_{16}FN_3O_5$	2 x Hydroxylation- C_2H_2 (R_2 :- C_2H_2)
CPR-S 31	338.1281	339.1360	6.00	0.4	$C_{17}H_{18}FN_3NaO_2$	Sodiado-O (R_0 :-O)
CPR-S 32	347.1281	348.1366	5.96	1.9	$C_{17}H_{18}FN_3O_4$	Hydroxylation

ENROFLOXACINA- SALICORNIA EUROPAEA**ENROFLOXACINE- SALICORNIA EUROPAEA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-S 1	73.0891	74.0962	0.92	-10.3	C ₁₄ H ₁₁ N	Parent-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8 :-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F)
ENR-S 2	115.0997	116.1070	6.12	-4.5	C ₆ H ₁₃ NO	Acetylation-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F (R_8:-C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F)
ENR-S 3	146.1055	147.1145	10.41	8.0	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2 x Hydroxylation-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F (R_7:-C ₁₃ H ₈ NO ₃ F)
ENR-S 4	247.0645	248.0708	11.63	-6.0	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃	Parent-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6:-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-S 5	249.0801	250.0877	9.74	-0.9	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	Reduction-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6 :-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-S 6	272.0961	273.1024	15.27	-5.5	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂ O ₂	Alcohols dehydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 7	279.0543	280.0629	12.33	2.9	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₅	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₁₂ N ₂ (R_6 :-C ₆ H ₁₂ N ₂)
ENR-S 8	290.1067	291.1151	7.47	2.2	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₃	Parent-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 9	291.1019	292.1091	4.78	-2.1	C ₁₄ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-S 10	292.1223	293.1304	12.41	1.0	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₃	Reduction-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 11	303.1383	304.1475	2.57	4.6	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-S 12	303.1019	304.1094	3.57	-1.1	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₃	Deethylation-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-S 13	306.1016	307.1091	7.43	-0.9	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Hydroxylation-C ₄ H ₇ N (R_5 :-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 14	308.1172	309.1231	10.06	-6.3	C ₁₅ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Hydration-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 15	313.0964	314.1033	2.61	-3.0	C ₁₅ H ₁₅ FN ₂ NaO ₃	Sodiado-C ₄ H ₇ N (R_5:-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 16	313.1227	314.1296	7.67	-2.7	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₂	Alcohols dehydration-C ₂ H ₄ (R_3:-C ₂ H ₄)
ENR-S 17	317.1176	318.1241	10.06	-4.0	C ₁₆ H ₁₆ FN ₃ O ₃	Demethylation-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-S 18	321.1489	322.1584	4.36	5.4	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Reduction-C ₃ H ₄ (R_4 :-C ₃ H ₄)
ENR-S 19	323.1634	324.1714	3.85	0.7	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	Alcohols dehydration-F+H (R_1:-F+H)
ENR-S 20	325.1590	326.1675	6.75	2.0	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O	Alcohols dehydration-O (R_0 :-O)
ENR-S 21	329.1540	330.1634	4.38	5.0	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₂	Hydroxymethylene loss
ENR-S 22	331.1332	332.1403	6.59	-2.2	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Deethylation
ENR-S 23	332.1172	333.1234	8.98	-4.9	C ₁₇ H ₁₇ FN ₂ O ₄	Acetylation-C ₄ H ₇ N (R_5 :-C ₄ H ₇ N)
ENR-S 24	333.1489	334.1560	2.73	-2.0	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Parent-C ₂ H ₂ (R_2:-C ₂ H ₂)
ENR-S 25	342.1230	343.1296	6.34	-3.5	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-S 26	342.1230	343.1327	7.09	5.6	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₃ H ₄ (R_4:-C ₃ H ₄)
ENR-S 27	345.1853	346.1950	3.45	-4.2	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₂	Reduction-O (R_0:-O)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
ENR-S 28	347.1281	348.1344	5.45	-4.4	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-S 29	351.1594	352.1657	6.34	-4.4	C ₁₇ H ₂₂ FN ₃ O ₄	Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
ENR-S 30	354.1230	355.1293	5.58	-4.2	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₄ (R_3 :-C ₂ H ₄)
ENR-S 31	356.1386	357.1446	6.75	-5.2	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ NaO ₃	Sodiado-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
ENR-S 32	361.1438	362.1508	6.59	-2.2	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	Acetylation-C ₃ H ₄ (R_4 :-C ₃ H ₄)
ENR-S 33	361.1802	362.1894	8.64	4.0	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₃	Reduction
ENR-S 34	365.1387	366.1464	12.07	3.0	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-C ₂ H ₂ (R_2 :-C ₂ H ₂)
ENR-S 35	366.1594	367.1667	8.35	-1.3	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ NaO ₂	Sodiado-O (R_0 :-O)
ENR-S 36	373.1638	374.1724	3.53	2.2	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-S 37	373.1638	374.1716	8.39	0.1	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	2 x Hydroxylation-F+H (R_1 :-F+H)
ENR-S 38	391.1543	392.1613	6.75	-2.2	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₅	2 x Hydroxylation

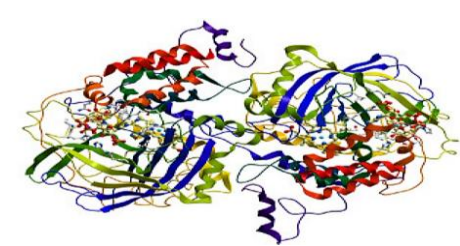
DICLOFENACO-SALICORNIA EUROPAEA**DICLOFÉNAC-SALICORNIA EUROPAEA**

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL-S 1	106.0419	107.0495	6.08	-1.6	C ₇ H ₆ O	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 2	106.0419	107.0492	6.97	-4.4	C ₇ H ₆ O	Hydroxymethylene loss-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 3	118.0419	119.0487	1.42	-8.2	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 4	118.0419	119.0493	3.69	-3.1	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 5	118.0419	119.0490	6.24	-5.6	C ₈ H ₆ O	Alcohols dehydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 6	122.0368	123.0443	5.16	-2.3	C ₇ H ₆ O ₂	Demethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 7	122.0368	123.0445	6.34	-0.7	C ₇ H ₆ O ₂	Demethylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 8	133.0528	134.0586	6.24	-14.8	C ₈ H ₇ NO	Alcohols dehydration-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 9	136.0524	137.0532	4.36	-14.9	C ₈ H ₈ O ₂	Parent-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 10	137.0477	136.0383	3.69	-5.3	C ₇ H ₇ NO ₂	Demethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 11	137.0477	136.0384	6.00	-1.8	C ₇ H ₇ NO ₂	Demethylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 12	151.0633	152.0718	2.39	4.4	C ₈ H ₉ NO ₂	Parent-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 13	151.0633	150.0540	7.63	-3.5	C ₈ H ₉ NO ₂	Parent-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3 :-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 14	152.0473	151.0378	5.71	-5.3	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 15	152.0473	153.0547	7.39	-2.9	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 16	153.0790	154.0860	4.28	-5.1	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Reduction-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 17	154.0630	153.0534	8.19	-5.9	C ₈ H ₁₀ O ₃	Hydration-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 18	167.0582	168.0654	3.95	-3.8	C ₈ H ₉ NO ₃	Hydroxylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 19	168.0423	169.0490	5.28	-6.3	C ₈ H ₈ O ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 20	168.0428	167.0325	7.07	-5.1	C ₈ H ₈ O ₄	2 x Hydroxylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 21	169.0739	170.0806	2.39	-6.5	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Hydration-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 22	169.0739	170.0803	4.74	-8.2	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Hydration-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 23	174.0531	175.0596	2.73	-7.5	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Sodiado-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 24	174.0531	173.0433	3.53	-5.2	C ₈ H ₉ NNaO ₂	Parent-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 25	178.0630	179.0695	5.58	-7.3	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 26	178.0630	179.0691	6.16	-9.5	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
DCL-S 27	178.0630	179.0690	9.10	-10.1	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Acetylation-C ₆ H ₃ NCl ₂ (R_5:-C ₆ H ₃ NCl ₂)
DCL-S 28	193.0739	194.0799	6.08	-9.3	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Acetylation-C ₆ H ₂ Cl ₂ (R_3:-C ₆ H ₂ Cl ₂)
DCL-S 29	231.0451	232.0546	5.28	7.4	C ₁₃ H ₁₀ ClNO	Hydroxymethylene loss-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-S 30	249.0112	250.0185	13.64	-2.0	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ N	Hydroxymethylene loss-O (R_0:-O)
DCL-S 31	279.0662	278.0585	3.56	0.3	C ₁₄ H ₁₄ ClNO ₃	Hydration-Cl+H (R_1 :-Cl+H)
DCL-S 32	281.0010	279.9924	14.09	-3.0	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₂	Demethylation
DCL-S 33	293.0455	294.0551	8.51	6.2	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₄	2 x Hydroxylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-S 34	303.0662	304.0751	12.87	3.6	C ₁₆ H ₁₄ ClNO ₃	Acetylation-Cl+H (R_1:-Cl+H)
DCL-S 35	311.0116	310.0053	7.26	4.8	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	Hydroxylation
DCL-S 36	313.0272	314.0331	8.09	-6.2	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ NO ₃	Hydration
DCL-S 37	337.0272	338.0361	13.22	3.1	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ NO ₃	Acetylation

IBUPROFENO- *SALICORNIA EUROPAEA***IBUPROFÈNE- *SALICORNIA EUROPAEA***

Nombre/ Nom	Masa teórica/ Masse theorique	m/z encontrada/ m/z trouvé	tr minutos/ tr minutes	Error (ppm)/ Erreur (ppm)	Fórmula/ Formule	Ruta/ Voie
IBU-S 1	192.1150	191.1053	9.36	-5.1	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	Demethylation
IBU-S 2	222.1256	221.1158	8.56	-5.0	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Hydroxylation
IBU-S 3	238.1205	237.1110	6.89	-5.2	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	2 x Hydroxylation
IBU-S 4	238.1205	237.1133	15.02	2.5	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	2 x Hydroxylation
IBU-S 5	224.1412	223.1315	8.83	-5.7	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Hydration
IBU-S 6	224.1412	223.1316	9.43	-6.2	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Hydration
IBU-S 7	224.1412	223.1320	9.73	-5.6	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Hydration
IBU-S 8	224.1412	223.1317	14.85	-7.8	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Hydration



ANEXO II

ANNEXE II

A continuación se muestra la lista de la colección de 150 plantas del entorno del Parque Nacional de Doñana cuyos extractos en cuatro disolventes distintos han sido empleados en los ensayos enzimáticos y antioxidantes.

Ci-dessous se trouve la liste de la collection de 150 plantes de la région autour du Parc National de Doñana dont les extraits dans quatre solvants différents ont été utilisés dans des essais enzymatiques et antioxydants.

LISTA DE PLANTAS/ LISTE DES PLANTES

- | | |
|--|--|
| 1.- <i>Eucalyptus</i> | 28.- <i>Ceratonia siliqua</i> L. |
| 2.- <i>Anthemis aaronsohnii</i> Eig. | 29.- <i>Prunus Pisardi</i> |
| 3.- <i>Anacyclus radiatus</i> Loisel | 30.- <i>Ononis spinosa</i> L. |
| 4.- <i>Borago officinalis</i> L. | 31.- <i>Arundo donax</i> . |
| 5.- <i>Echium plantaginem</i> L. | 32.- <i>Phragmites australis</i> |
| 6.- <i>Fumaria agraria</i> Lag. | 33.- <i>Viola x wittrockiana</i> (<i>Viola tricolor</i> L.) |
| 7.- <i>Ephedra fragilis</i> . | 34.- <i>Terminalia catappa</i> L. |
| 8.- <i>Lotus creticus</i> L. | 35.- <i>Richardia bresiliensis</i> |
| 9.- <i>Cakile maritima</i> Scop. | 36.- <i>Echium vulgare</i> L. |
| 10.- <i>Medicago marina</i> L. | 37.- <i>Taraxacum afghanicus</i> Soest. |
| 11.- <i>Reichardia</i> sp. | 38.- <i>Avena</i> L. |
| 12.- <i>Eryngium maritimum</i> L. | 39.- <i>Aloe striata</i> Haw. |
| 13.- <i>Pinus cembra</i> . | 40.- <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter |
| 14.- <i>Quercus ilex</i> L. | 41.- <i>Rumex roseus</i> L. |
| 15.- <i>Bougainvillea berberidifolia</i> Heimer L. | 42.- <i>Cedrus atlantica</i> |
| 16.- <i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd. | 43.- <i>Beta vulgaris</i> |
| 17.- <i>Jasminum abyssinicum</i> Hochst. ex DC | 44.- <i>Gerenium macrorrhizum</i> |
| 18.- <i>Olea ambrensis</i> H. Perrier | 45.- <i>Araucaria cunninghamii</i> Mudie |
| 19.- <i>Lonicera japonica</i> Thunb. | 46.- <i>Hemerocallis</i> |
| 20.- <i>Tecoma capensis</i> (Thumb.) Llindl | 47.- <i>Pelargonium zonale</i> |
| 21.- <i>Jacaranda mimosifolia</i> | 48.- <i>Phyllostachys aurea</i> Piviè & C.
Rivière |
| 22.- <i>Myrtus communis</i> L. | 49.- <i>Prunus cerasifera</i> Ehrh. |
| 23.- <i>Nerium oleander</i> L. | 50.- <i>Aloe aageodonta</i> L.E. Newton |
| 24.- <i>Duranta erecta</i> L. | 51.- <i>Yucca elephantipes</i> Regel ex Trel. |
| 25.- <i>Pandorea jasminoides</i> | 52.- <i>Pittosporum tobira</i> |
| 26.- <i>Blush noisette</i> | 53.- <i>Ficus carica</i> L. |
| 27.- <i>Arbutus unedo</i> L. | 54.- <i>Tagetes erecta</i> L. |

- | | |
|---|---|
| 55.- <i>Convolvulus arvensis</i> L. | 85.- <i>Nandina domestica</i> Thunb. |
| 56.- <i>Citrus x sinensis</i> | 86.- <i>Abelia x grandiflora</i> |
| 57.- <i>Viburnum Tinus</i> | 87.- <i>Ficus elastica</i> |
| 58.- <i>Phoenix reclinata</i> Jacq. | 88.- <i>Lantana montevidensis</i> |
| 59.- <i>Washisgtonia robusta</i> H. Wendl. | 89.- <i>Hedera helix</i> L. |
| 60.- <i>Phytolacca dioica</i> L. | 90.- <i>Cycas revoluta</i> Thunb. |
| 61.- <i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich | 91.- <i>Cyperus alternifolius</i> L. |
| 62.- <i>Quercus robur</i> L. | 92.- <i>Malvaviscus arboreus</i> |
| 63.- <i>Callistemon speciosus</i> (Sims.) Sweet | 93.- <i>Plumbago auriculata</i> Lam. |
| 64.- <i>Rosa abietina</i> Gren. ex H. Christ | 94.- <i>Ligustrum lucidum</i> |
| 65.- <i>Petunia axillaris</i> (Lam.) Britton | 95.- <i>Fraxinus excelsior</i> L. |
| 66.- <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze | 96.- <i>Triticum turgidum</i> . |
| 67.- <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> . | 97.- <i>Magnolia</i> L. |
| 68.- <i>Osteospermum ecklonis</i> . | 98.- <i>Parkinsonia aculeata</i> L. |
| 69.- <i>Campsis radicans</i> (L.) | 99.- <i>Onopordum acanthim</i> L. |
| 70.- <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl. | 100.- <i>Catalpa bignonioides</i> Walter |
| 71.- <i>Olea europaea</i> var. <i>Sylvestris</i> Brot | 101.- <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. |
| 72.- <i>Acanthus mollis</i> L. | 102.- <i>Saponaria officinalis</i> L. |
| 73.- <i>Brugmansia suaveolens</i> (Humb. & Bonpl. Ex Willd) | 103.- <i>Plectranthus neochilus</i> . |
| 74.- <i>Hemerocallis liliasthodelus</i> L. | 104.- <i>Cupressus abramsiana</i> C.B. Wolf |
| 75.- <i>Begonia cucullata</i> Willd | 105.- <i>Ipomea indica</i> |
| 76.- <i>Lagerstroemia indica</i> L. | 106.- <i>Lavandula dentata</i> |
| 77.- <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) | 107.- <i>Robinia pseudoacacia</i> L. |
| 78.- <i>Lycianthes rantonnetti</i> | 108.- <i>Eryngium maritimum</i> L. |
| 79.- <i>Hibisucus syriacus</i> L. | 109.- <i>Ricinus communis</i> L. |
| 80.- <i>Eucaliptus camaldelensis</i> Dehnh. | 110.- <i>Schinus molle</i> L. |
| 81.- <i>Vitex agnus-castus</i> L. | 111.- <i>Triticum tauschii</i> . |
| 82.- <i>Hemerocallis hydrid</i> « on and on » | 112.- <i>Centaurium erythraea</i> |
| 83.- <i>Ulmus pumila</i> | 113.- <i>Verbascum sinuatum</i> L. |
| 84.- <i>Agapanthus africanus</i> (L.) Hoffmanns | 114.- <i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich |

- | | |
|---|--|
| 115.- <i>Juniperus virginiana</i> L. | 133.- <i>Nashia inaguensis</i> Millsp. |
| 116.- <i>Platanus occidentalis</i> L. | 134.- <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn |
| 117.- <i>Achillea millefolium</i> L. | 135.- <i>Triticum aestivum</i> L. |
| 118.- <i>Albizia julibrissin</i> Durazz | 136.- <i>Vitis vinifera</i> L. |
| 119.- <i>Bauhinia forficata</i> Link. | 137.- <i>Litsea glaucescens</i> Kunth |
| 120.- <i>Cedrus deodara</i> (Roxb. ex D.Don)
G.Don | 138.- <i>Daphne gnidium</i> L. |
| 121.- <i>Pinus peuce</i> | 139.- <i>Myoporum laetum</i> G. Forts |
| 122.- <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 140.- <i>Mentha pulegium</i> |
| 123.- <i>Cotoneaster franchetii</i> Bois | 141.- <i>Anadenanthera peregrine</i> |
| 124.- <i>Nerium petite</i> Salmon | 142.- <i>Rubus ulmifolis</i> |
| 125.- <i>Cichorium intybus</i> L. | 143.- <i>Helichysum stoechas</i> (L.) Moench |
| 126.- <i>Pistacia</i> L. | 144.- <i>Cistus Salviifolius</i> L. |
| 127.- <i>Aloysia citriodora</i> | 145.- <i>Allium ampeloprasum</i> |
| 128.- <i>Cistus ladanifer</i> L. | 146.- <i>Tamarix gallica</i> L. |
| 129.- <i>Pistacia lentiscus</i> L. | 147.- <i>Acacia dealbata</i> . |
| 130.- <i>Cistus clusii</i> Dunal | 148.- <i>Pyrus communis</i> L. |
| 131.- <i>Lonicera x heckrottii</i> | 149.- <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth |
| 132.- <i>Lonicera ciliosa</i> DC | 150.- <i>Jazminum mesnyi</i> |



ANEXO III

ANNEXE III

En este anexo se muestran los porcentajes de inhibición (I%) de forma gráfica y en tablas con su correspondiente desviación estándar, obtenidos en los test enzimáticos de la colección de 150 plantas extraídas con cuatro disolventes distintos, es decir, 600 extractos (M) con las enzimas colagenasa (col.), elastasa (elast.), tirosinasa (con dos sustratos L-DOPA y L-Tirosina), lipoxigenasa (lipox.), los ensayos de antioxidantes de polifenoles, flavonoides y el porcentaje de actividad antioxidante (% A. Antiox.) de los ensayos de DPPH.

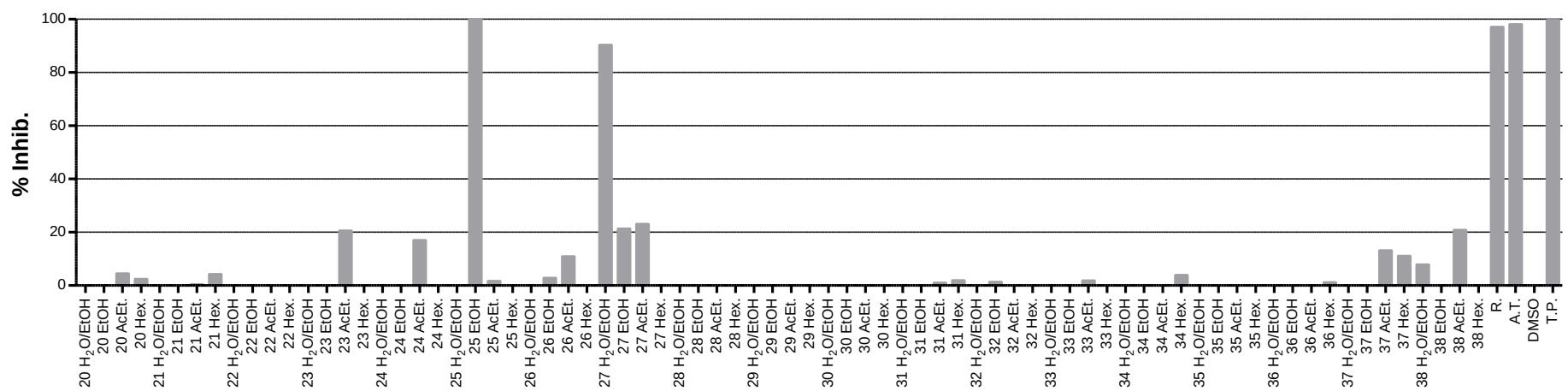
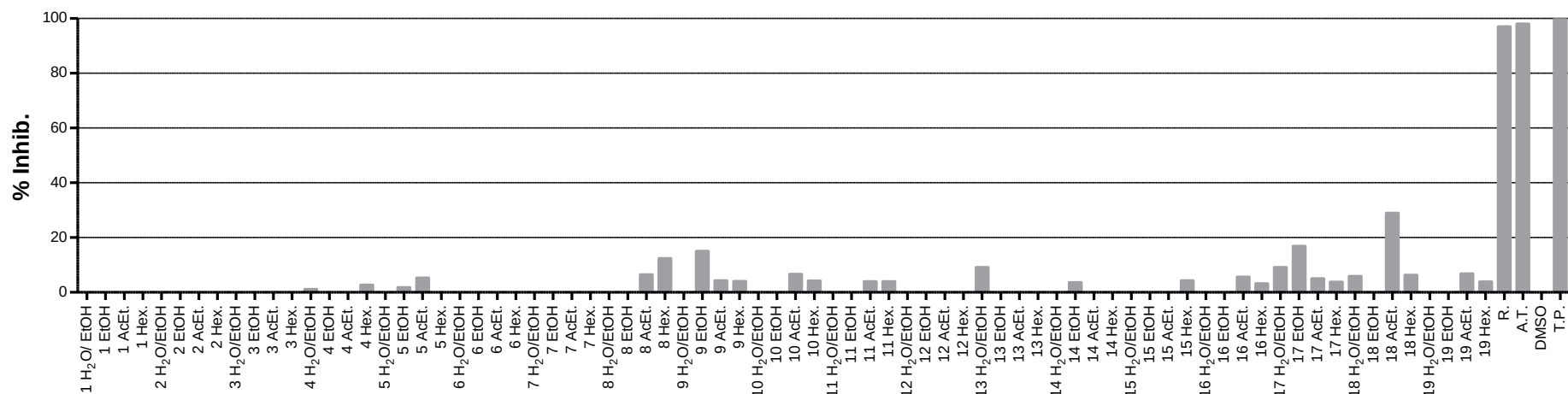
Además se recogen los resultados de los test las enzimas elastasa, lipoxigenasa y tirosinasa con ambos sustratos, así como los ensayos antioxidantes de polifenoles y DPPH de las matrices de tallo y raíz de las muestras de *Juncus sp.* sometidos al ensayo de exposición con distintos principios activos a varias concentraciones.

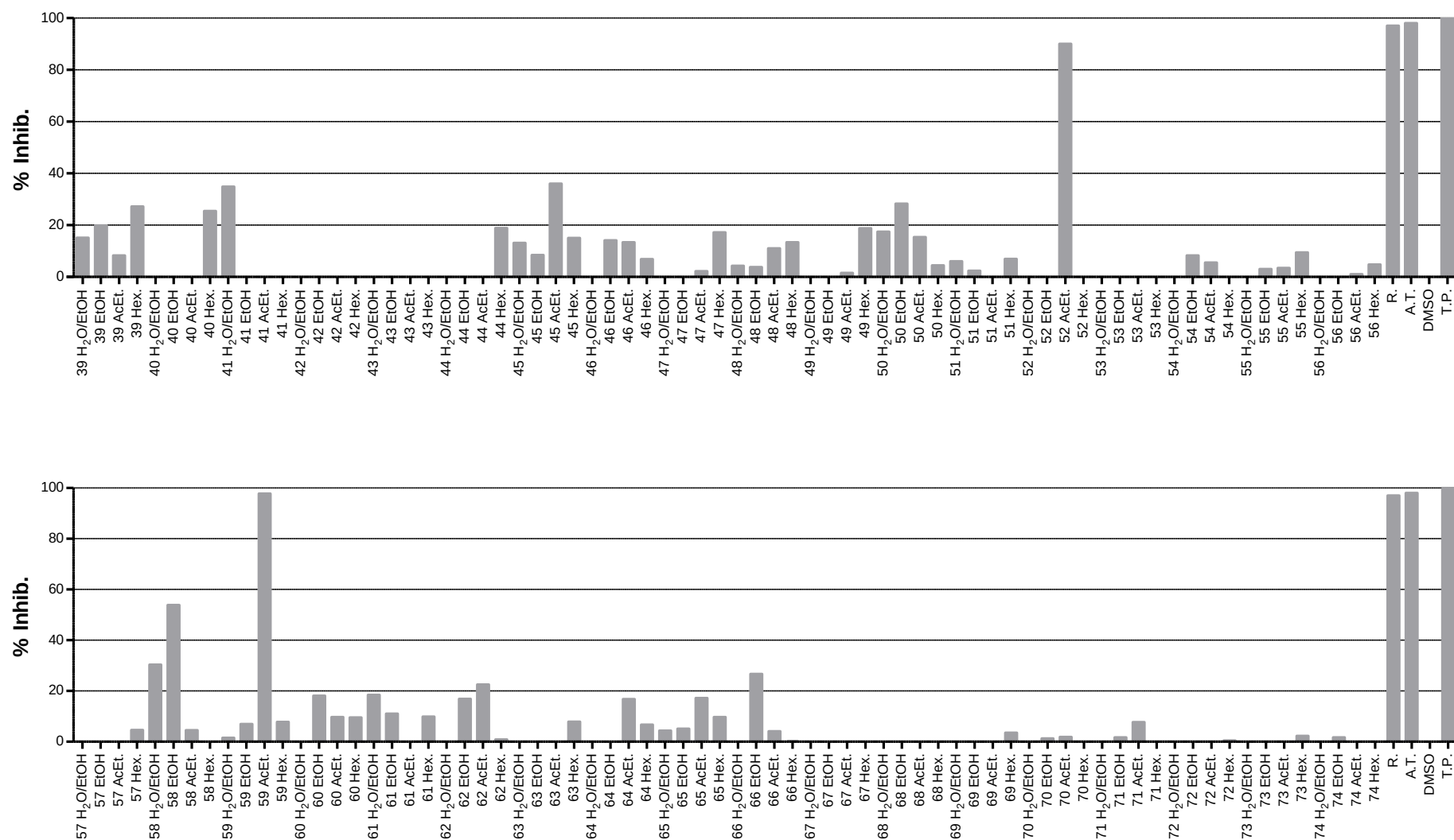
Dans cette annexe, les pourcentages d'inhibition (I %) sont représentés graphiquement et dans des tableaux avec leur écart-type correspondant, obtenu lors des essais enzymatiques de la collecte de 150 plantes extraites avec quatre solvants différents, soit 600 extraits (E) avec les enzymes collagénase (col.), élastase (elast.), tyrosinase (avec deux substrats L-DOPA et L-Tyrosine), lipoxygénase (lipox.), les tests antioxydants des polyphénols, flavonoïdes et le pourcentage d'activité antioxydante (% A. Antiox.) des essais de DPPH.

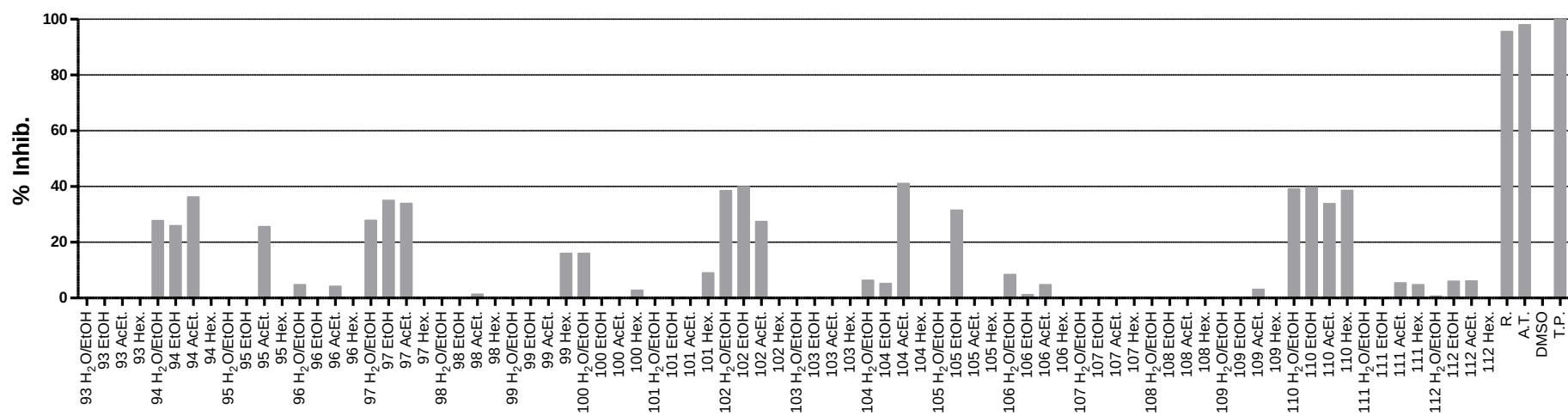
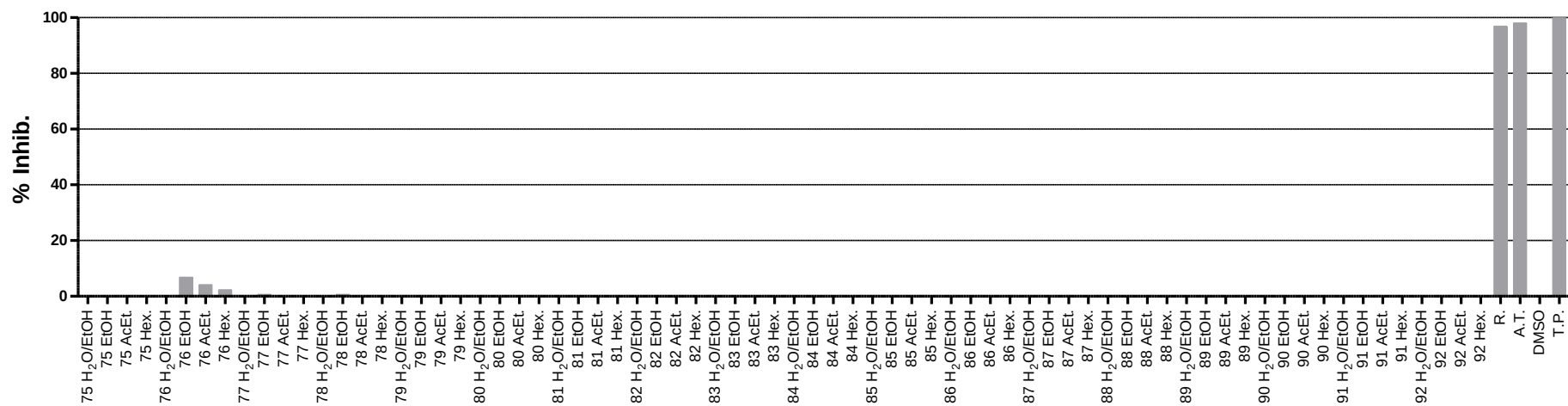
De plus, les résultats des enzymes élastase, lipoxygénase et tyrosinase avec les deux substrats, ainsi que les dosages des polyphénols et des antioxydants DPPH des matrices souches et racinaires des échantillons de *Juncus sp.* soumis au test d'exposition avec différents principes actifs à diverses concentrations sont recueillis.

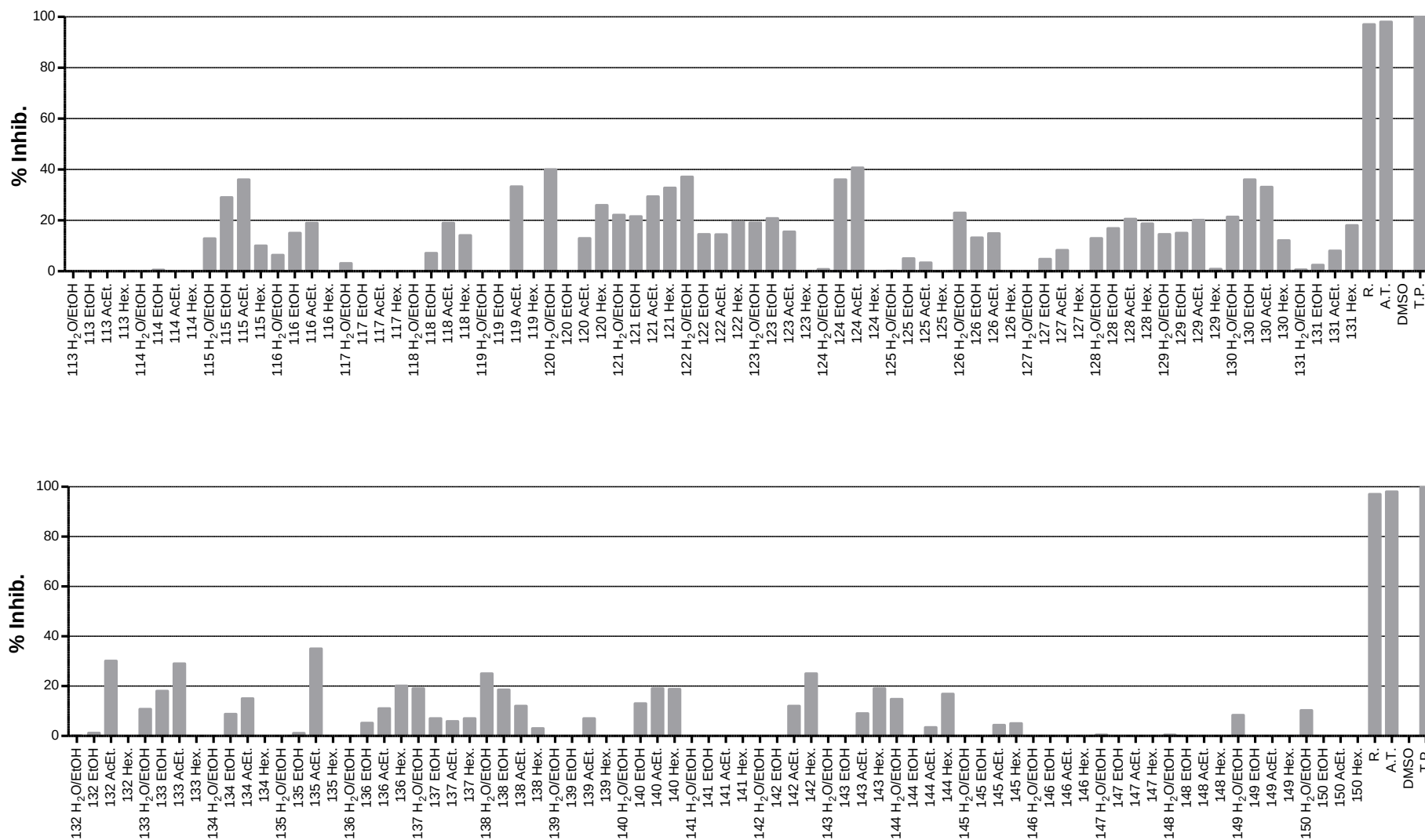
RESULTADOS ENZIMA COLAGENA: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

RÉSULTATS ENZYME COLLAGÉNASE: RÉPRESENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'INHIBITION ENZYMATIQUE



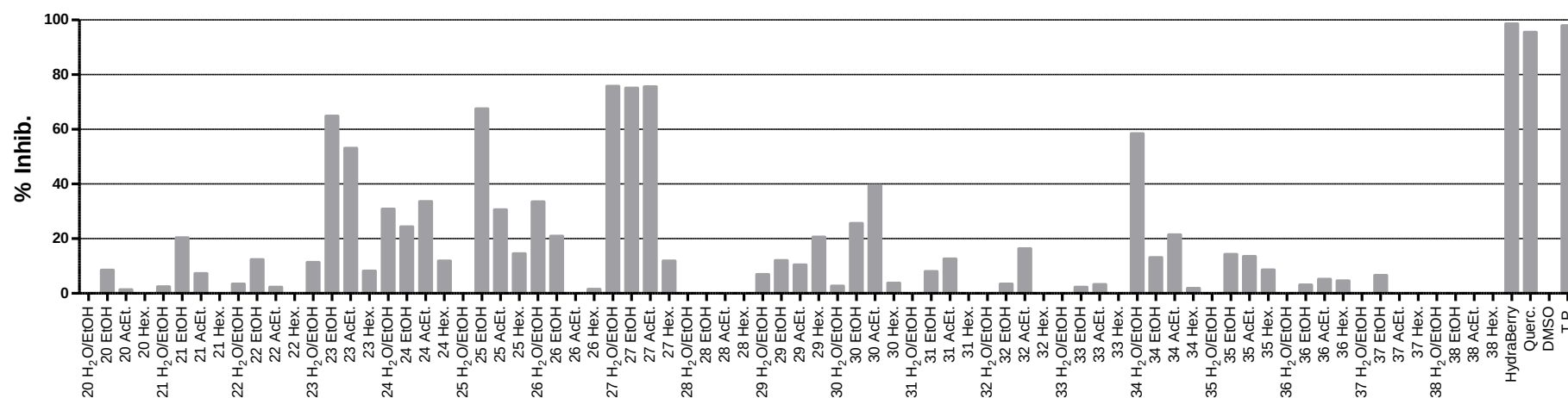
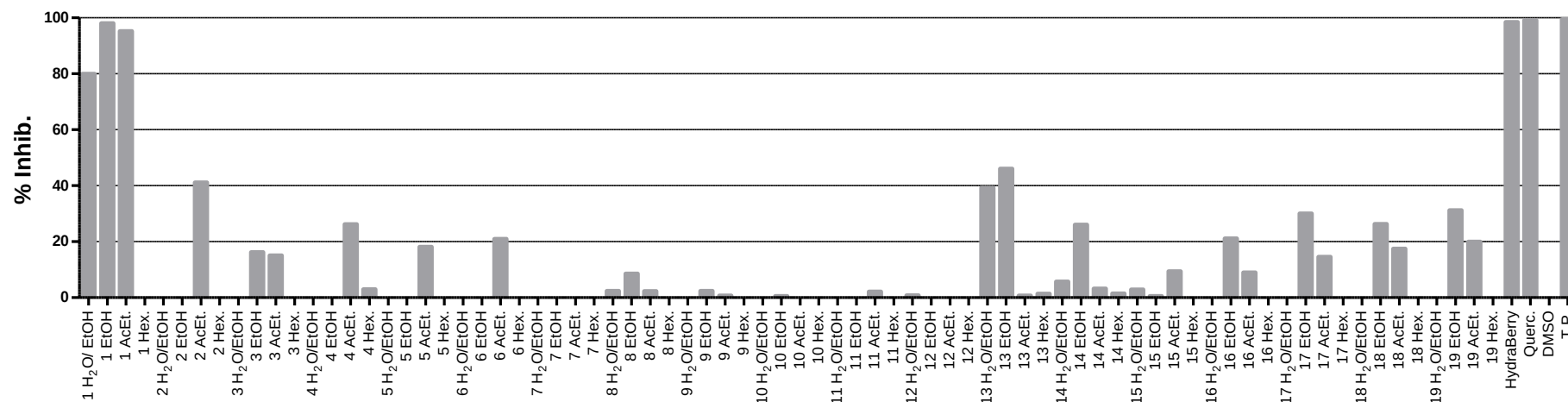


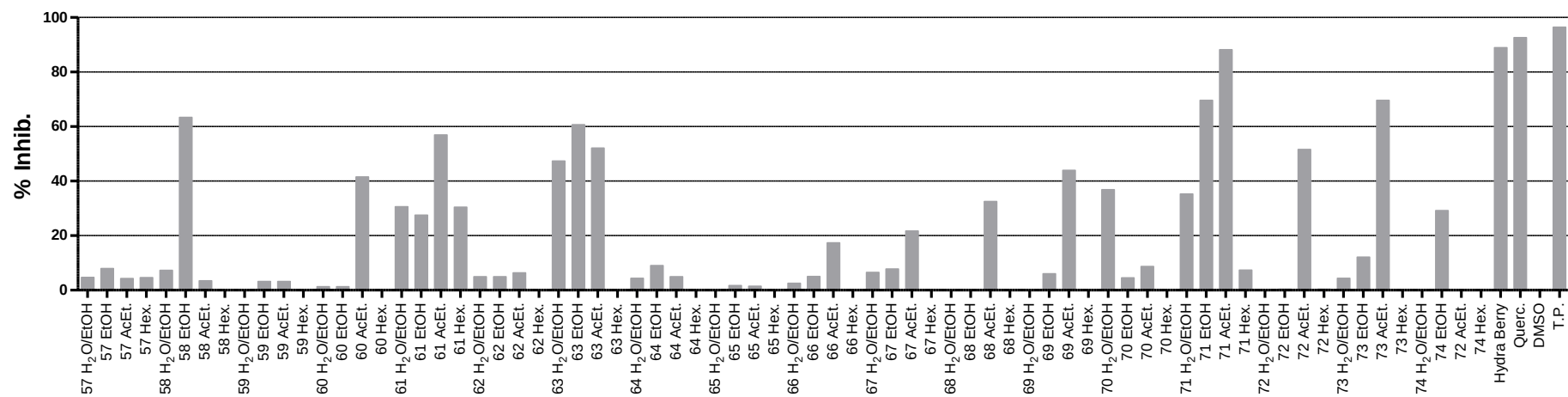
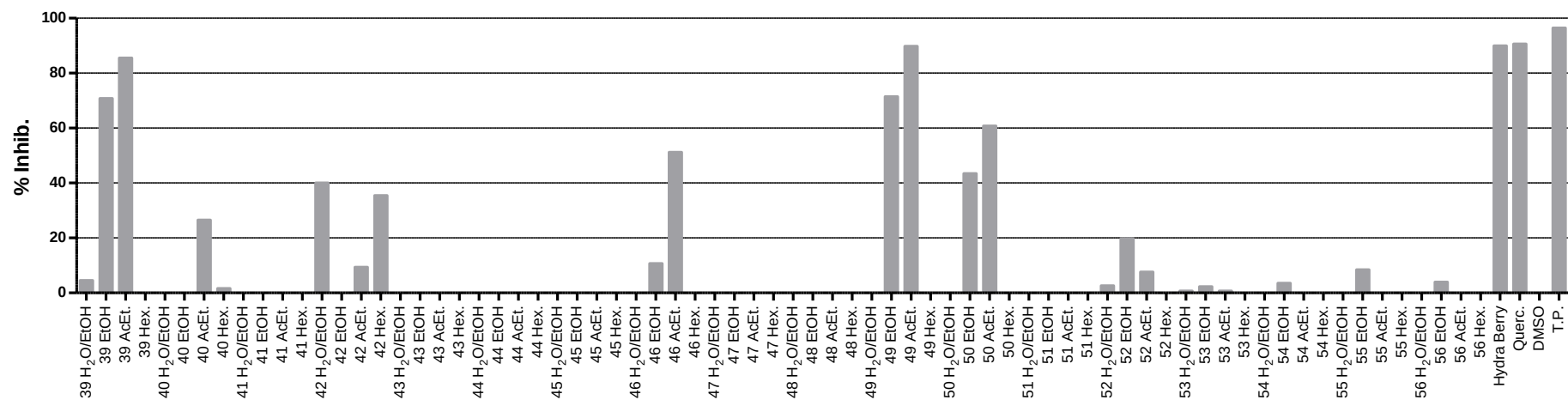


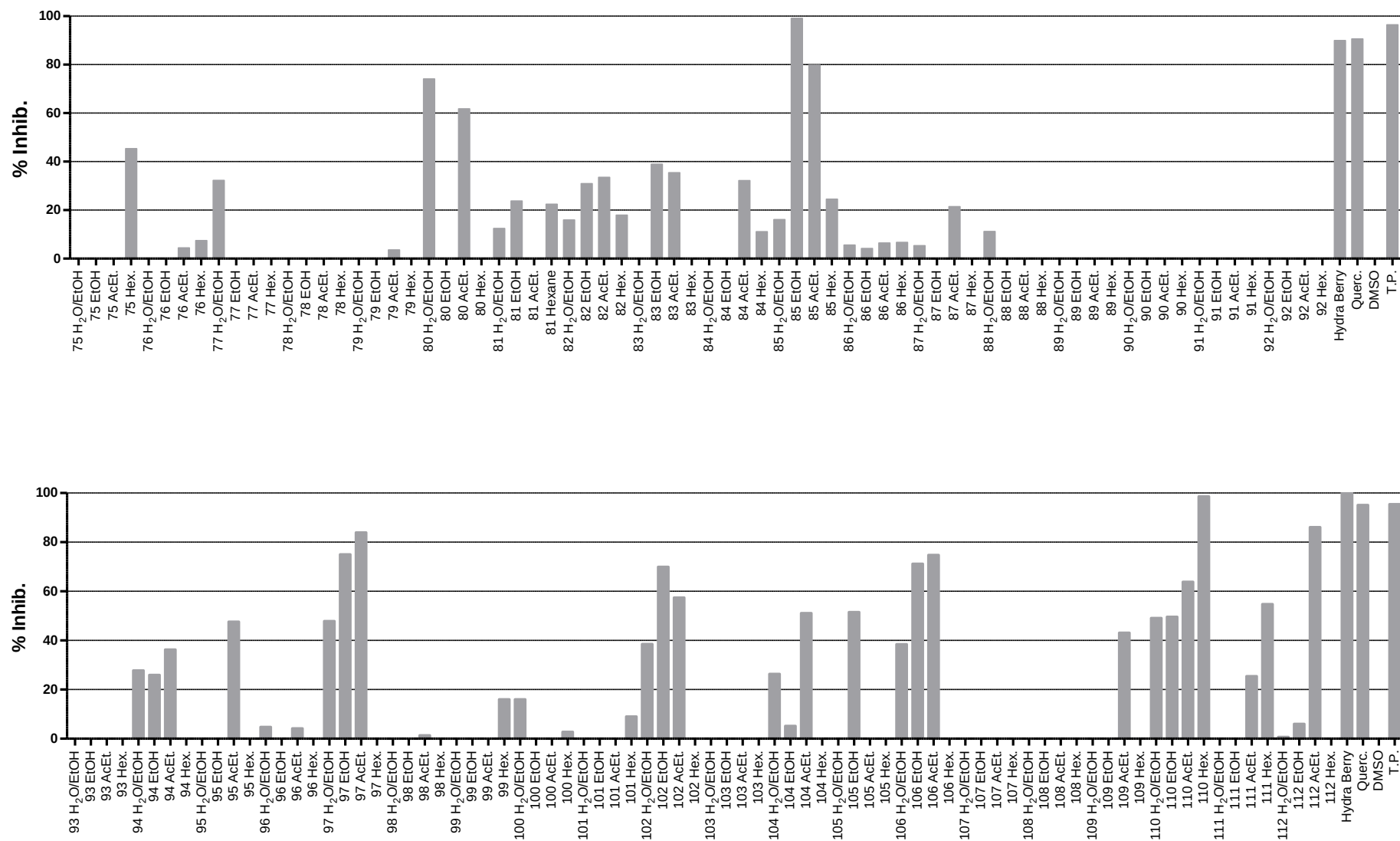


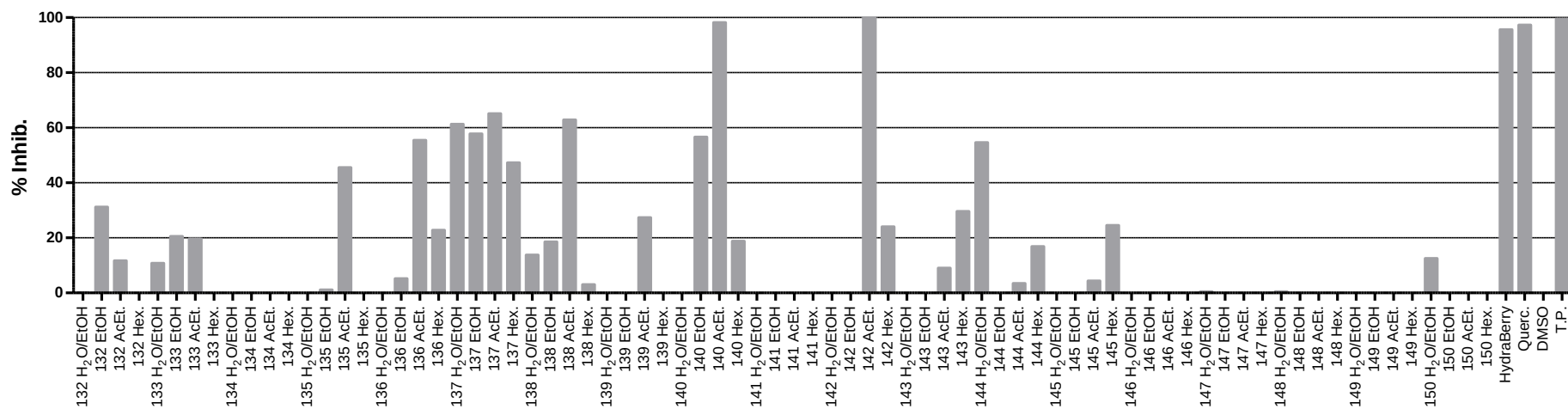
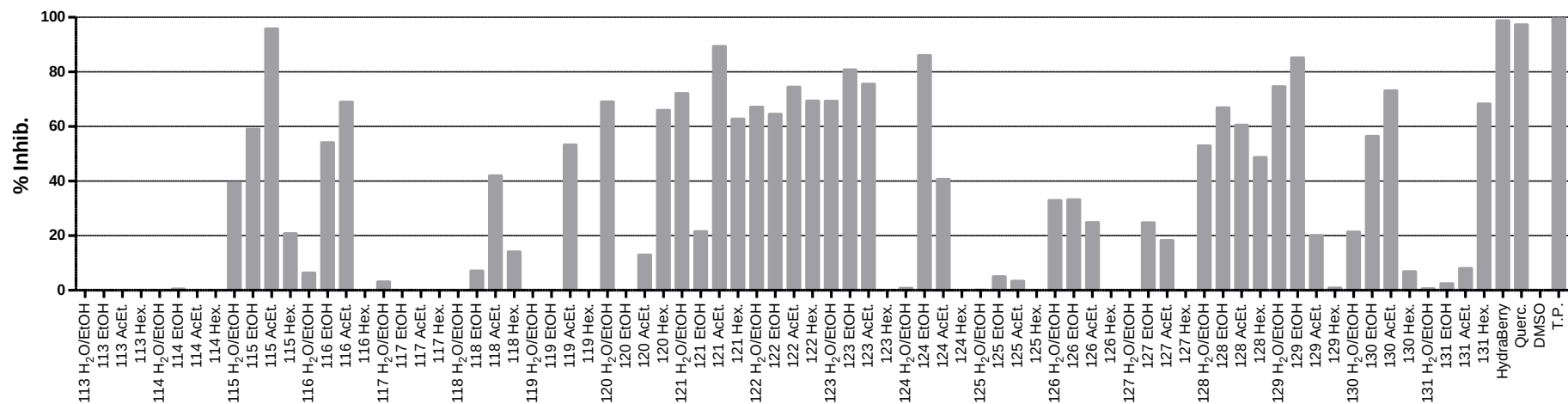
RESULTADOS ENZIMA ELASTASA: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

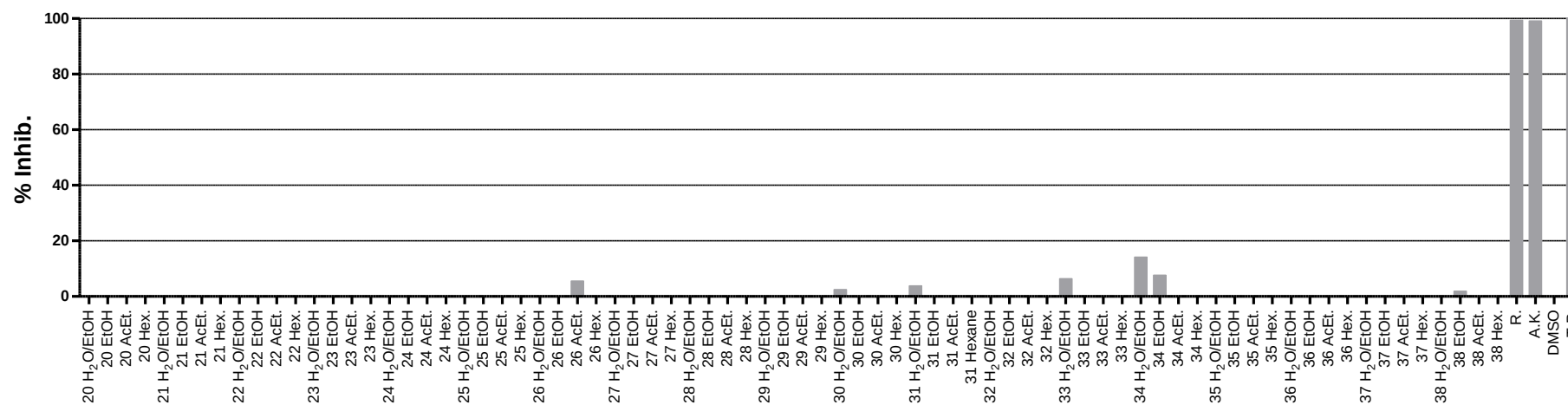
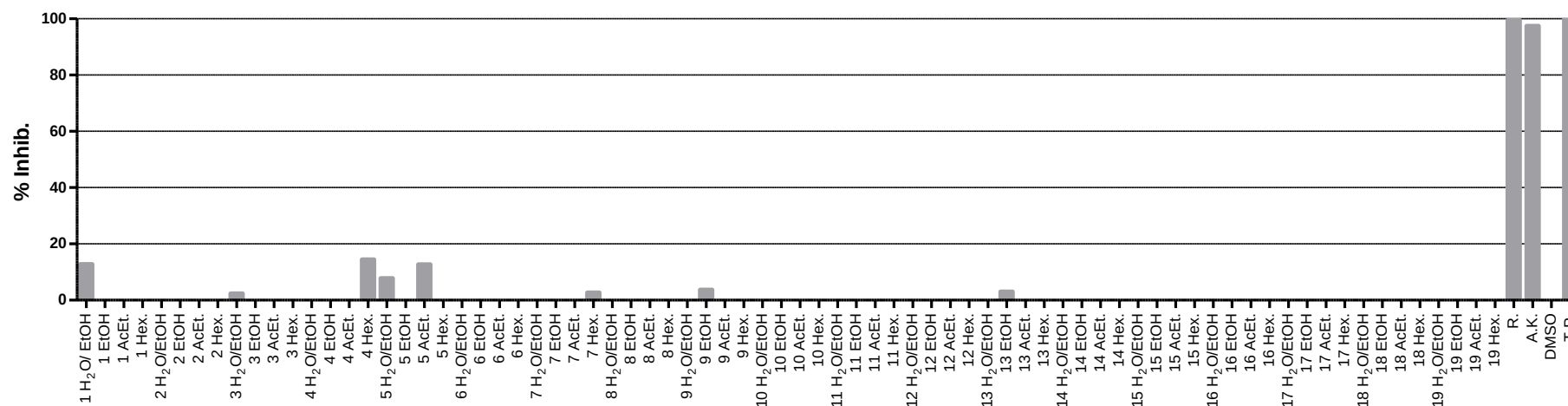
RÉSULTATS ENZYME ÉLASTASE: RÉPRESENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'INHIBITION ENZYMATIQUE

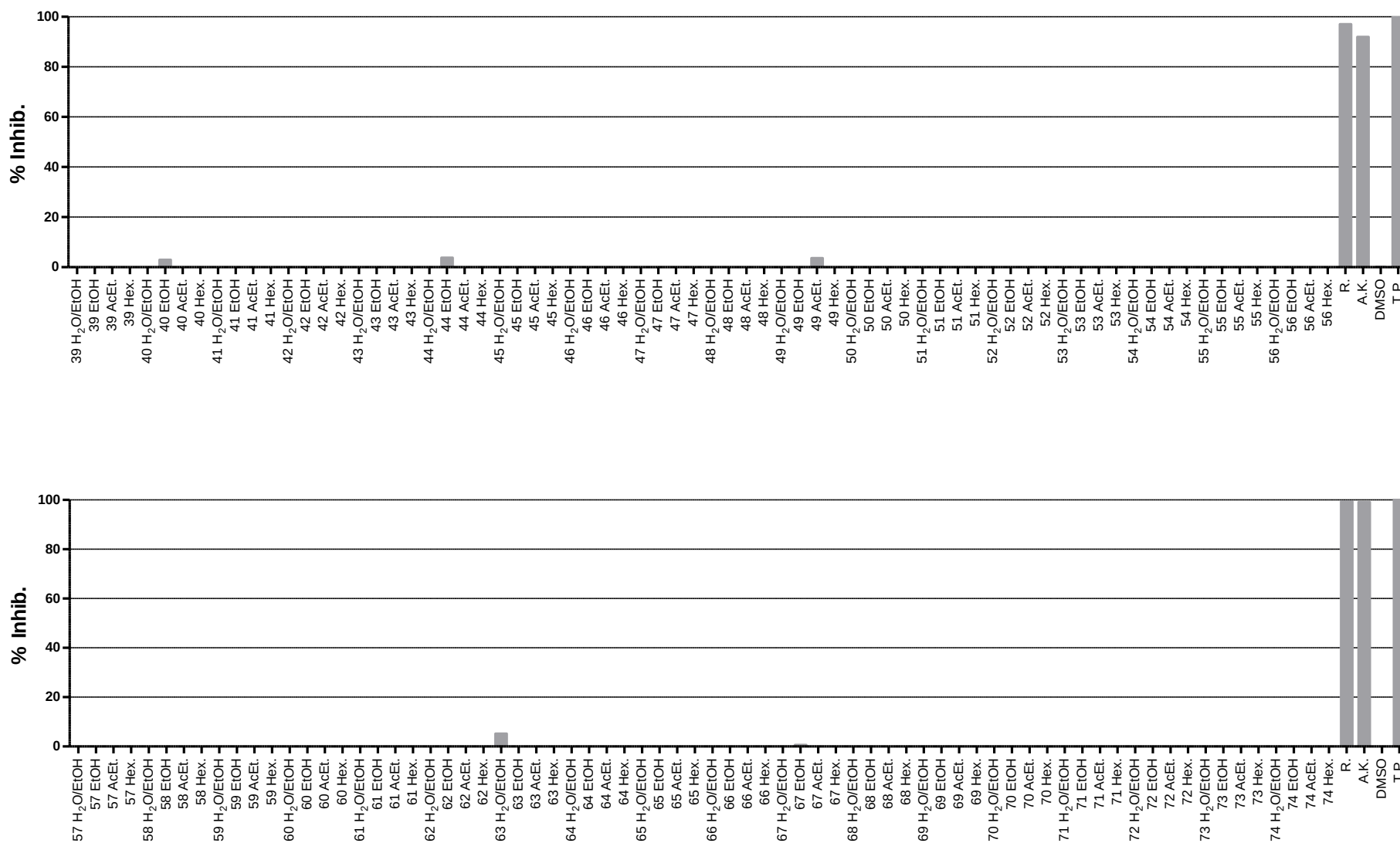


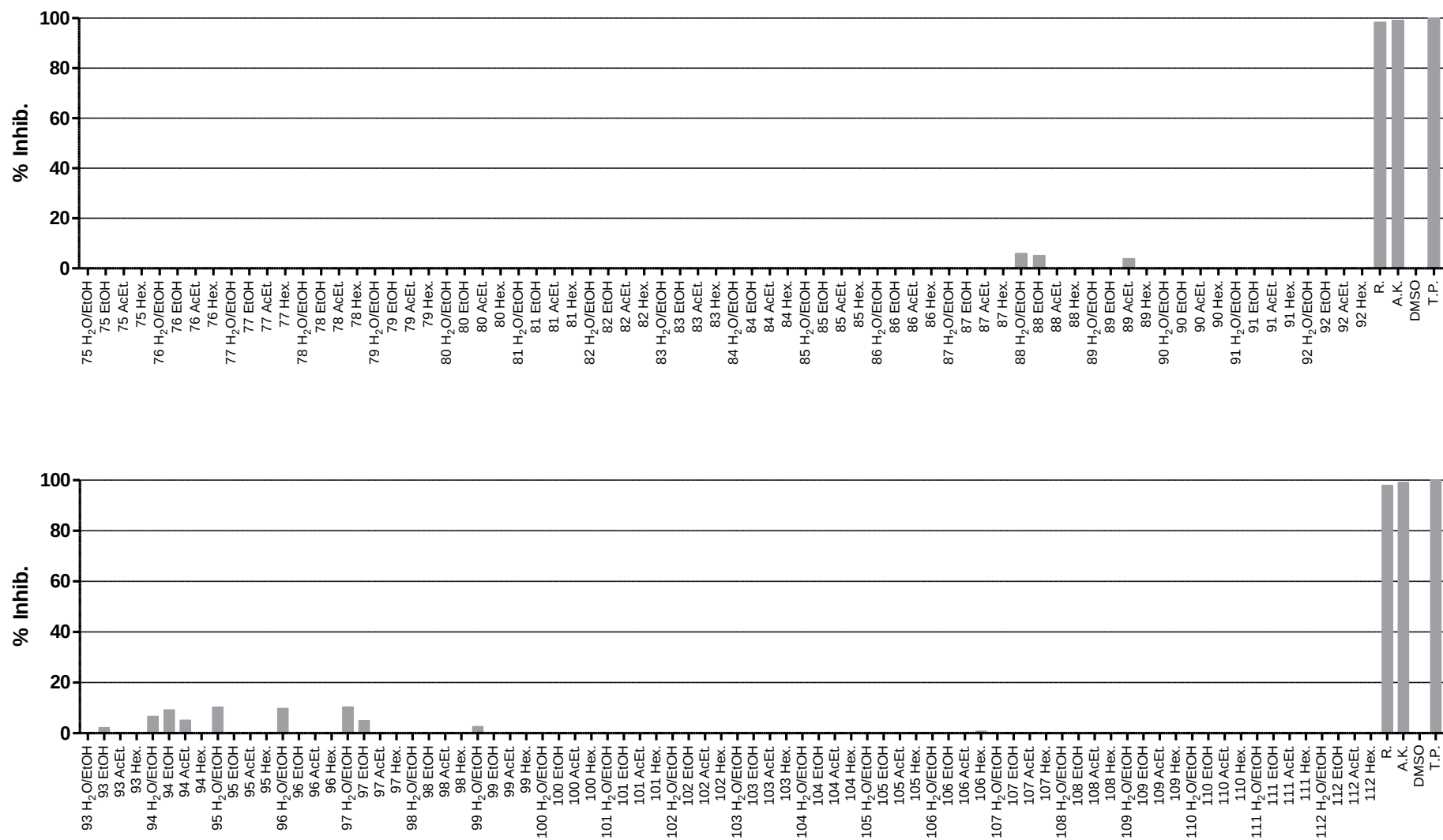


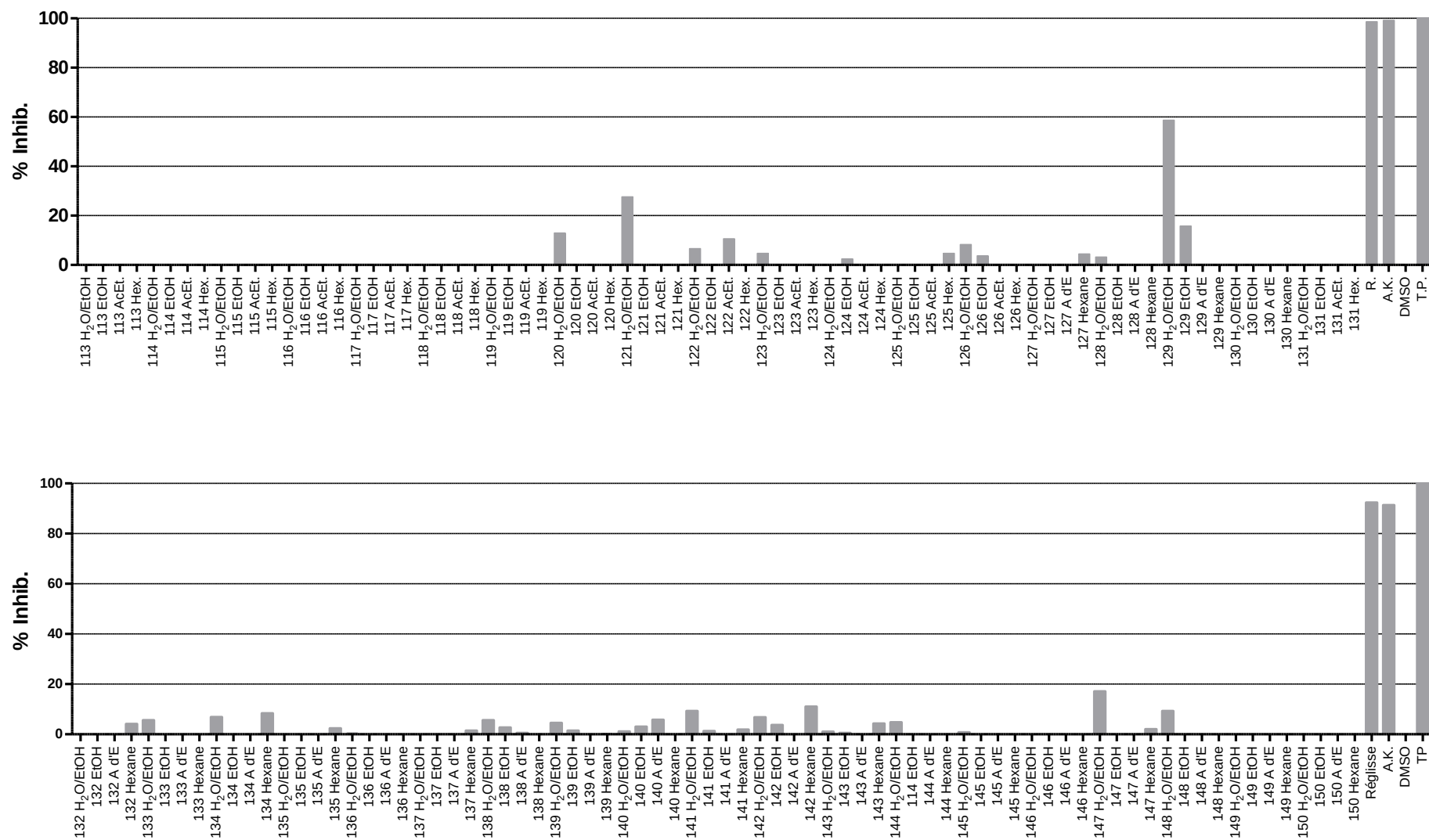




RESULTADOS ENZIMA TIROSINASA CON EL SUSTRATO L-TIROSINA: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**RÉSULTATS ENZYME TYROSINASE AVEC LE SUBSTRAT L-TYROSINE: RÉPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'INHIBITION ENZYMATIQUE**

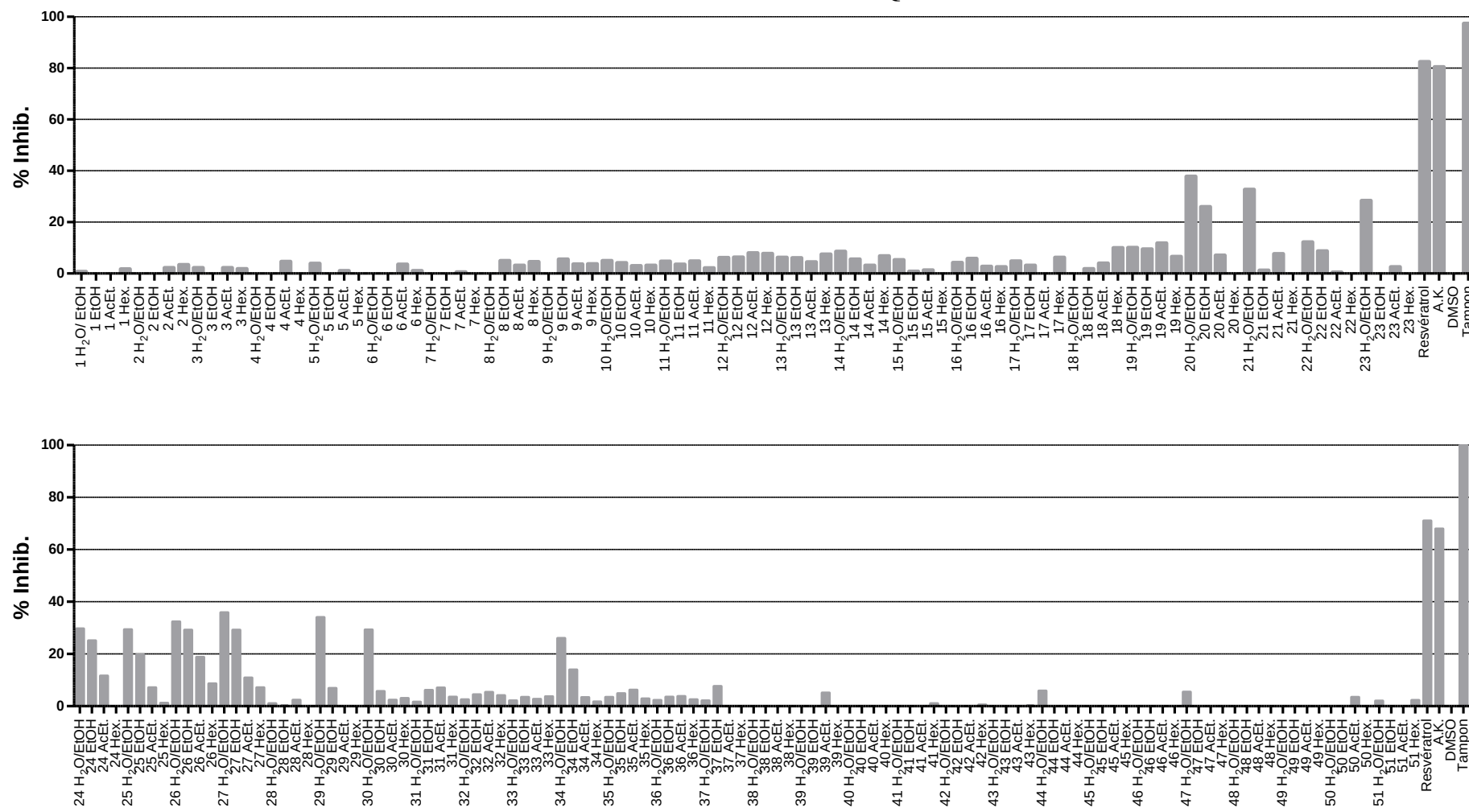


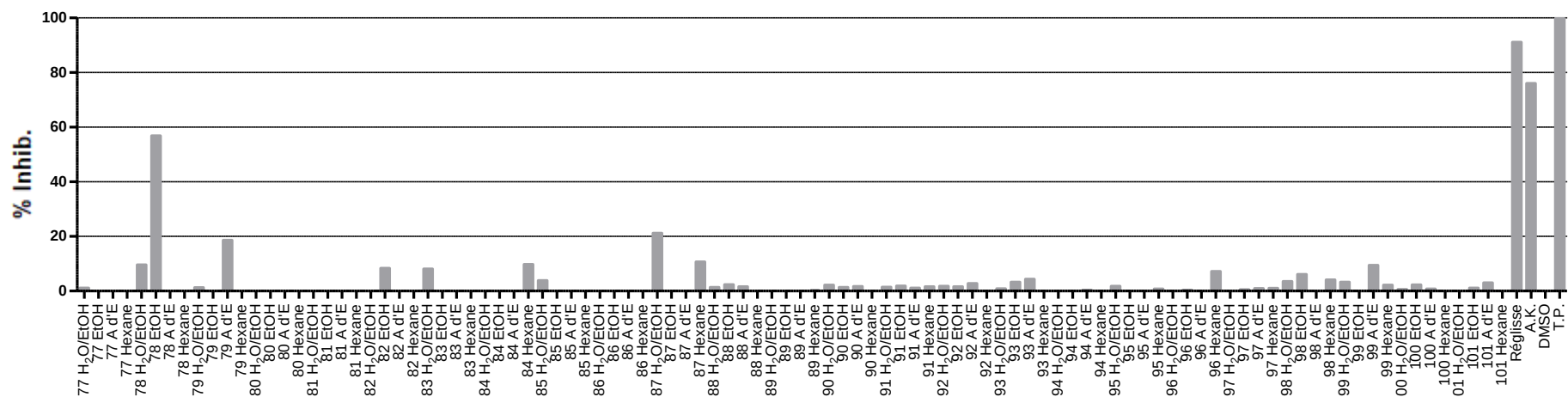
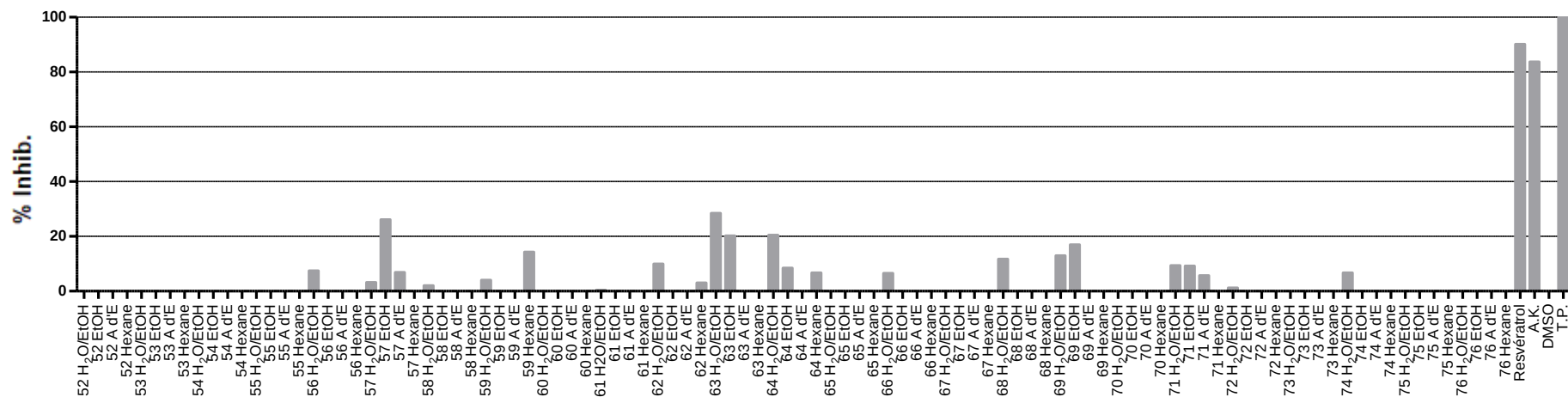


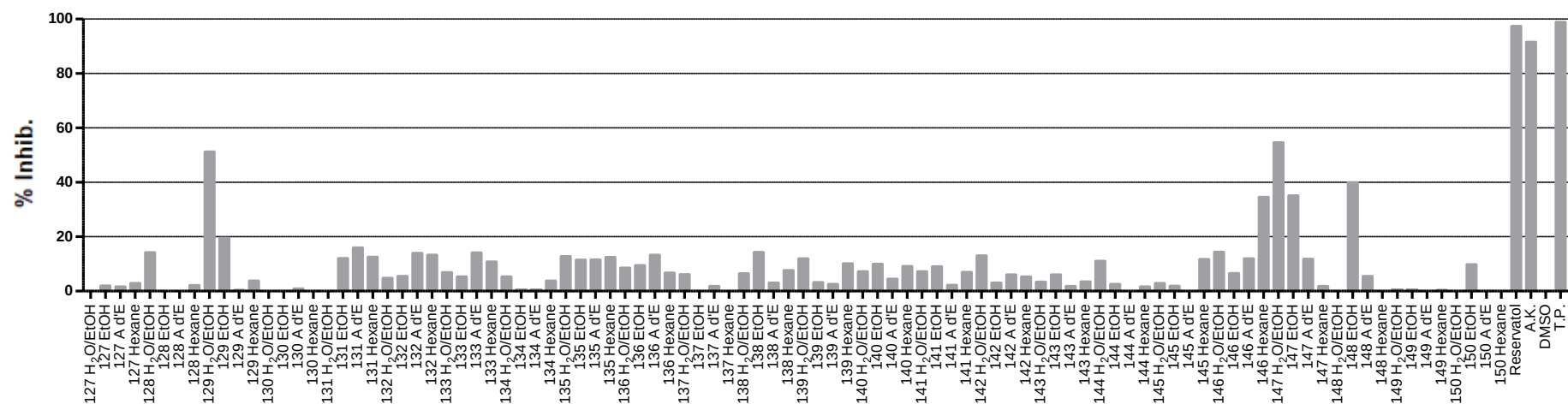
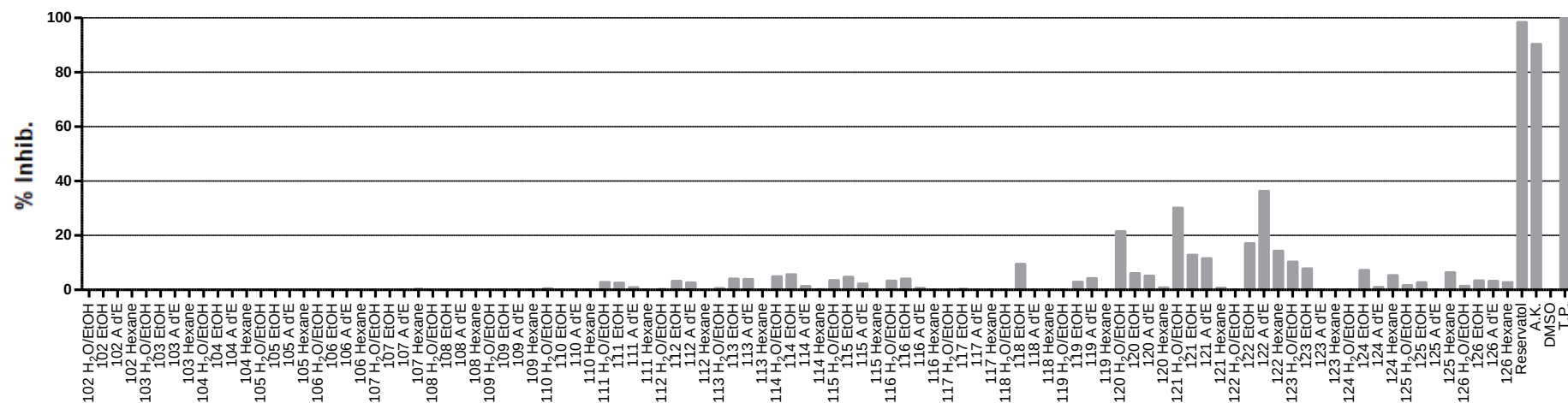


RESULTADOS ENZIMA TIROSINASA CON EL SUSTRATO L-DOPA: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

RÉSULTATS ENZYME TYROSINASE AVEC LE SUBSTRAT L-DOPA: RÉPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'INHIBITION ENZYMATIQUE

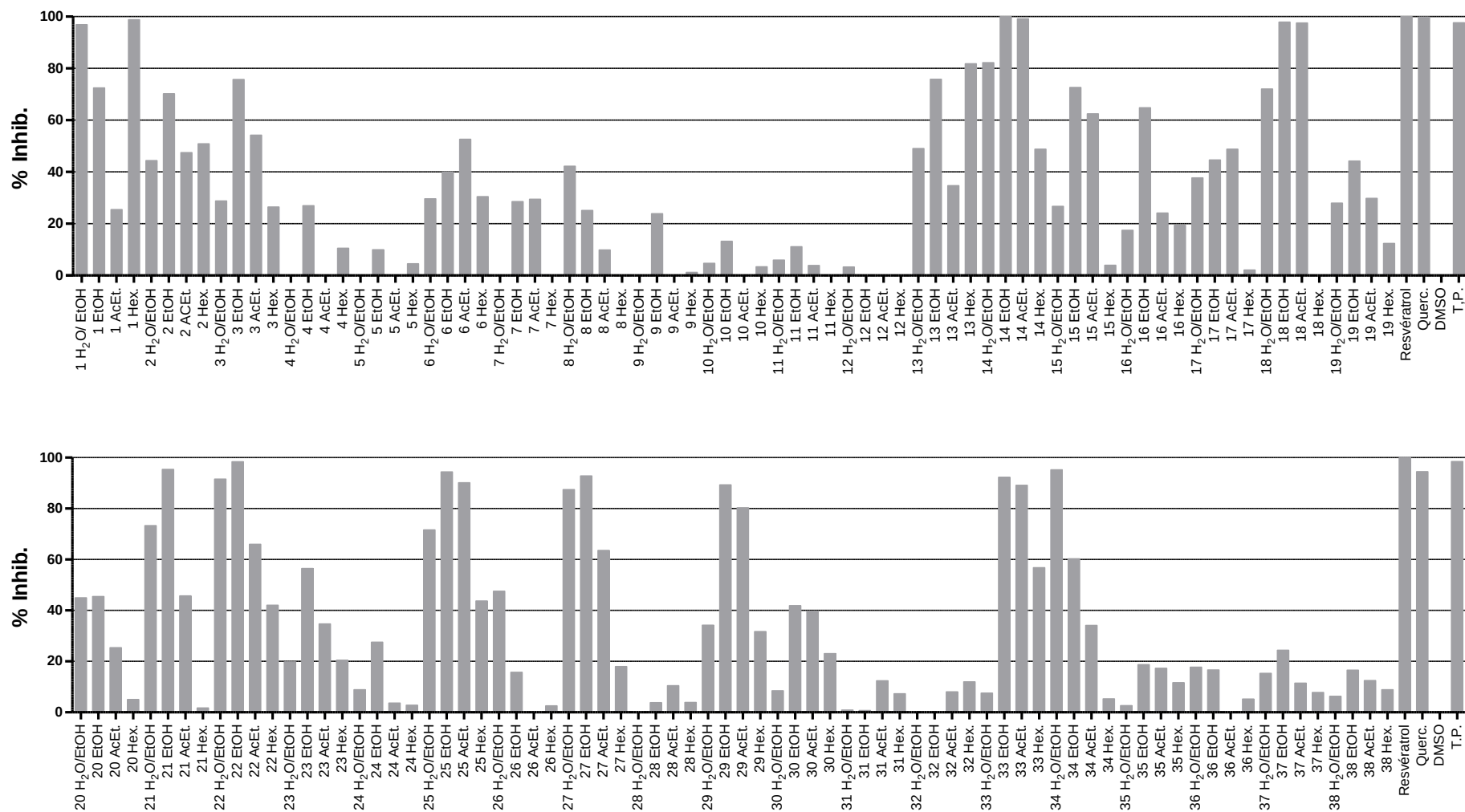


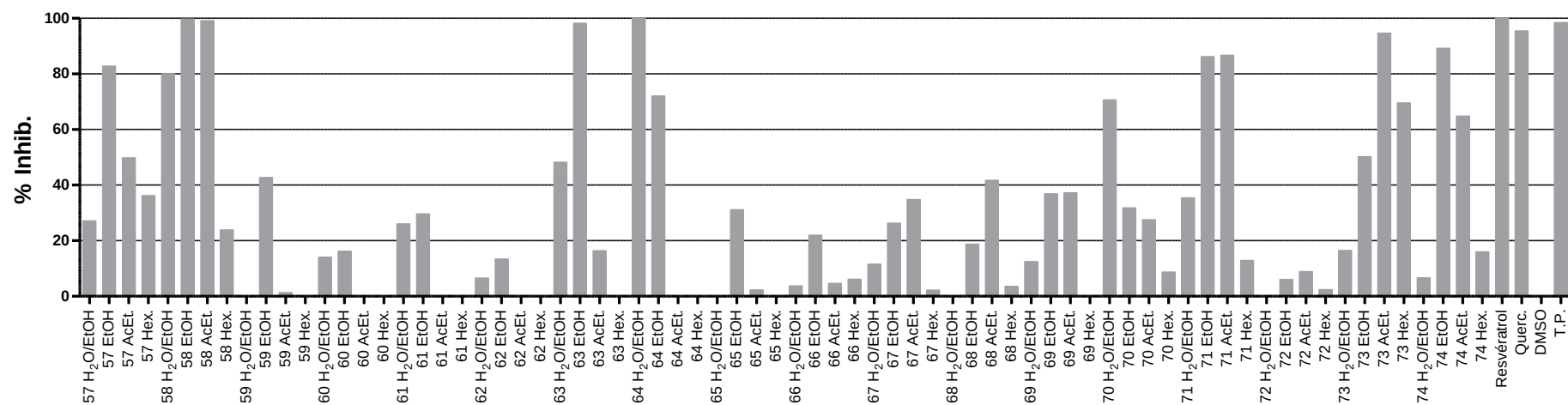
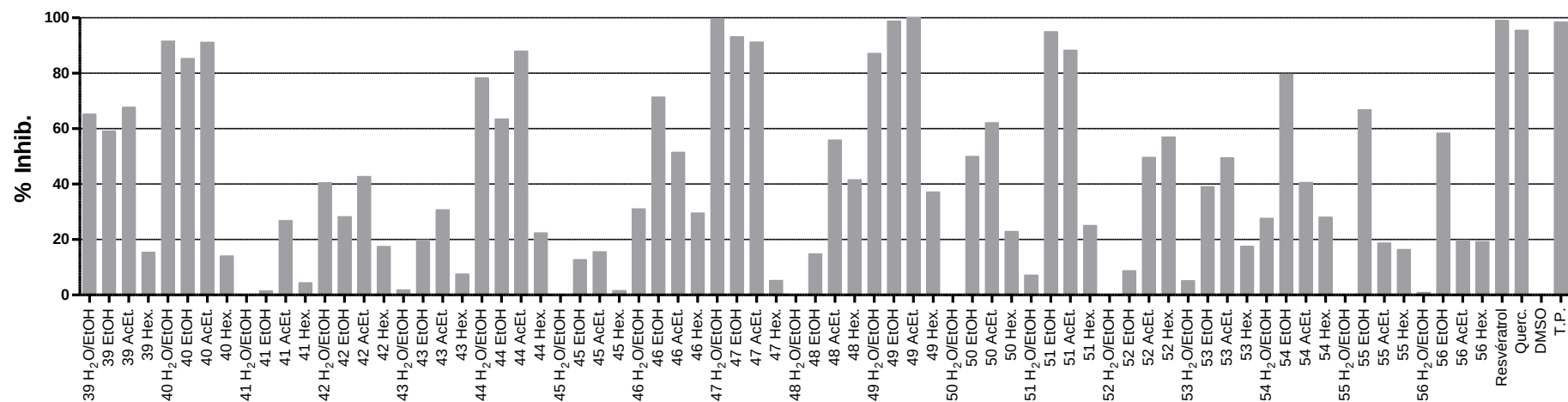


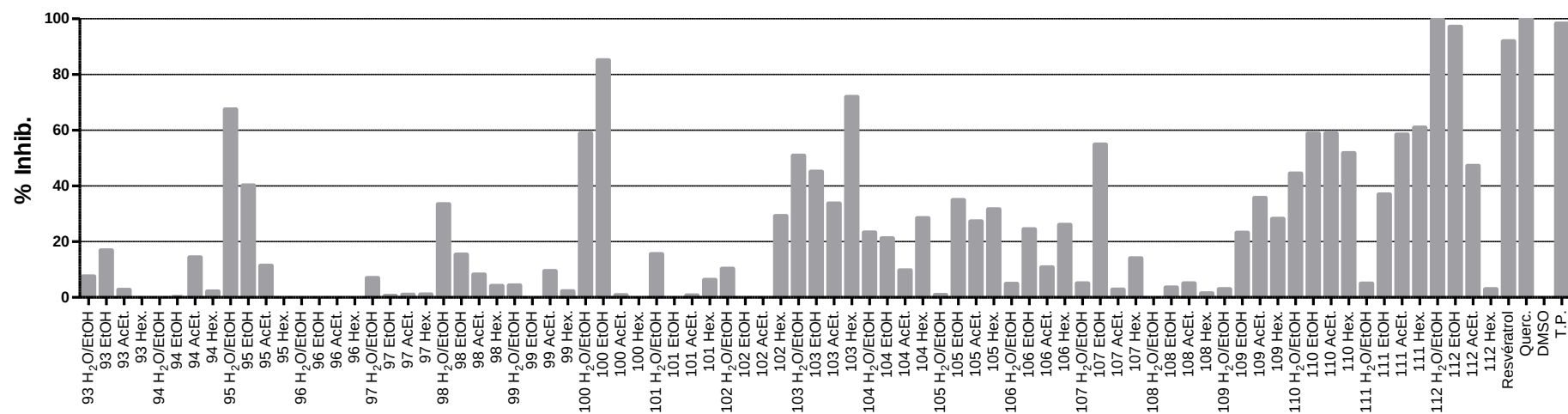
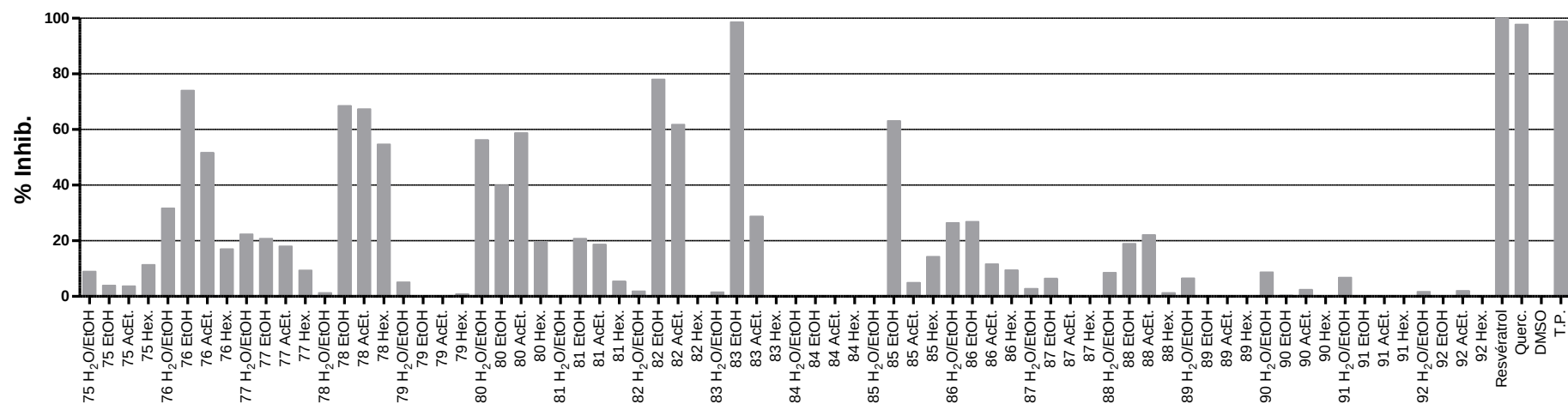


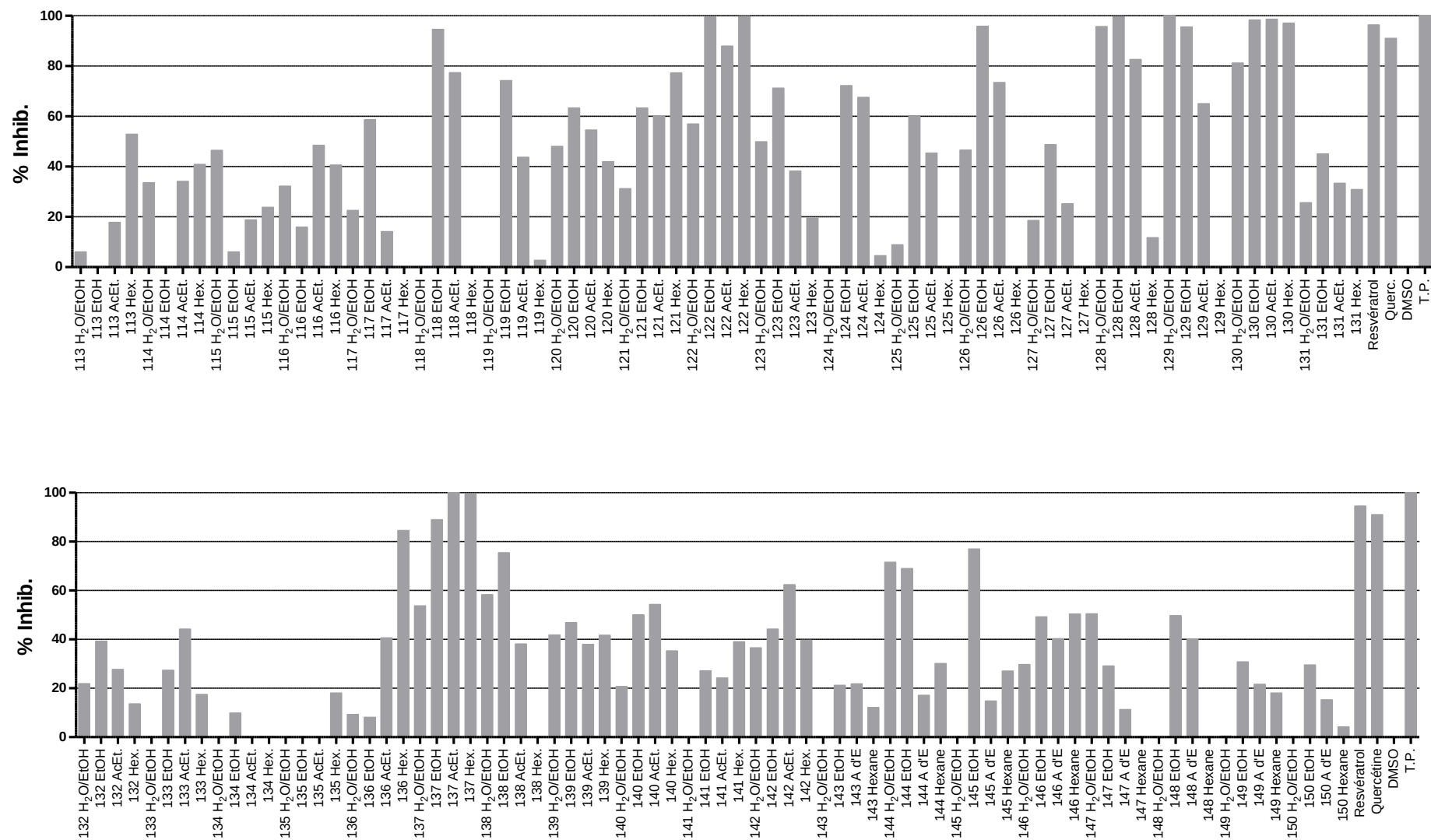
RESULTADOS ENZIMA LIPOXIGENASA: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

RÉSULTATS ENZYME LIPOXYGÉNASE: RÉPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'INHIBITION ENZYMATIQUE



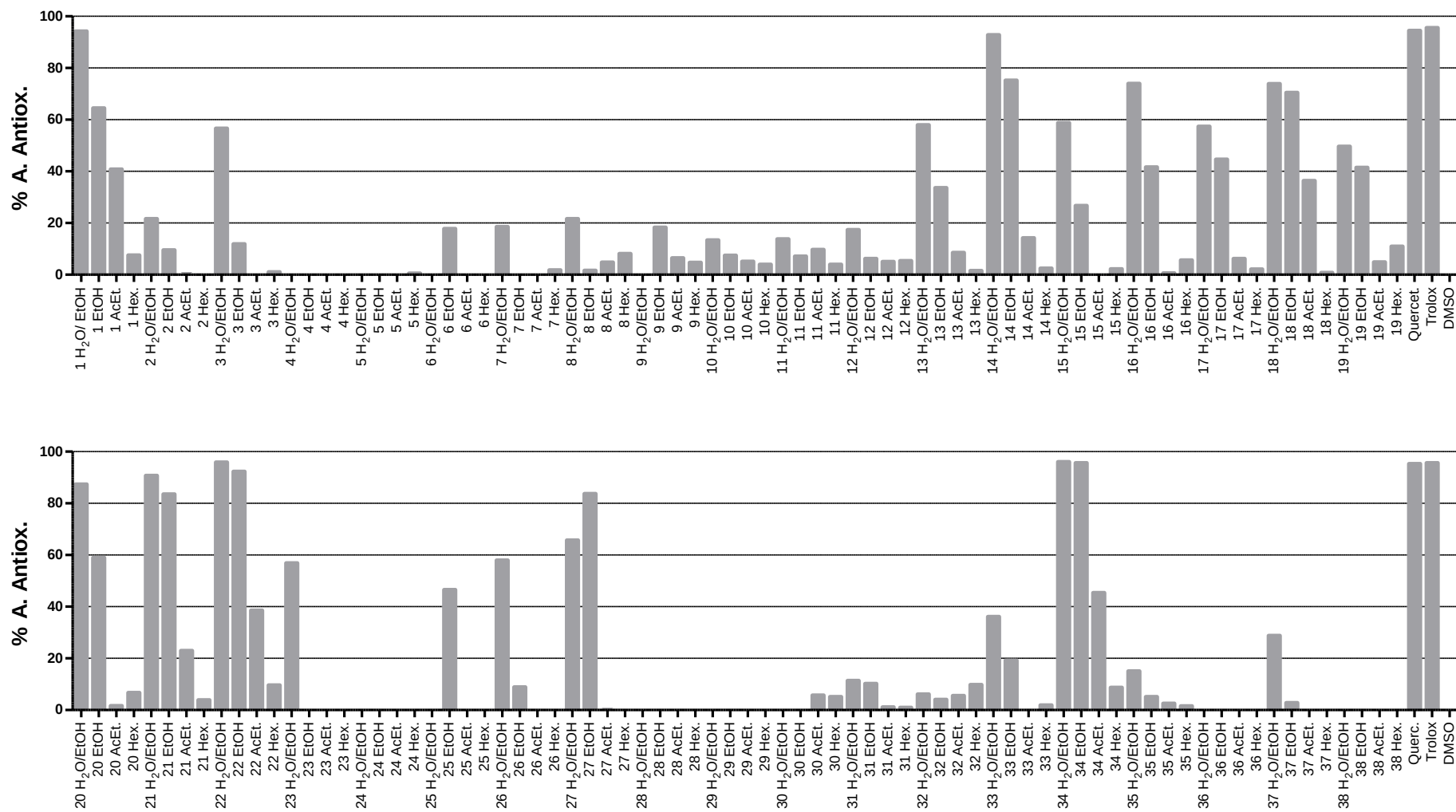


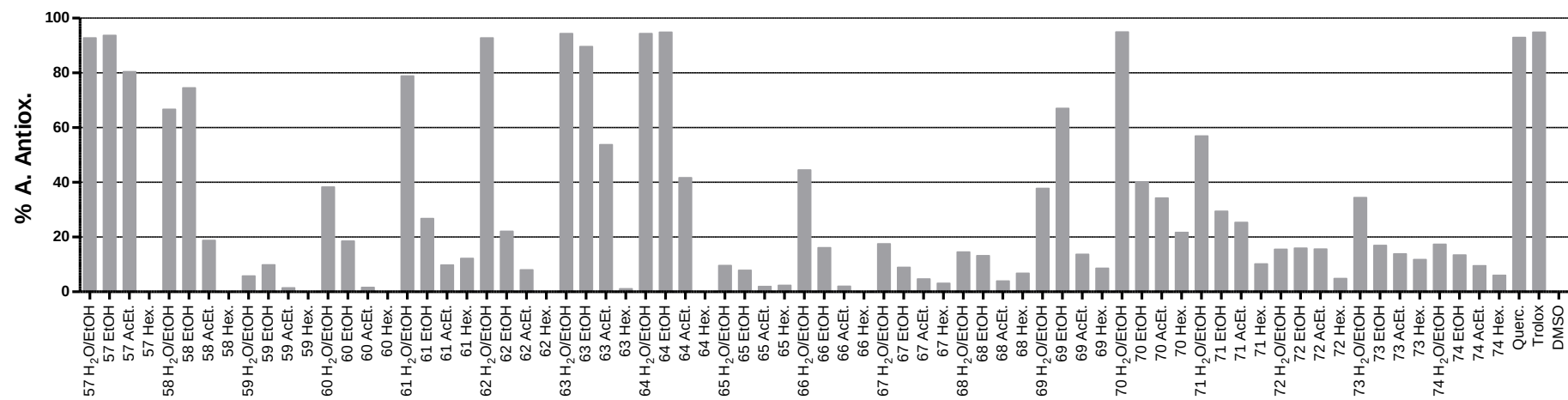
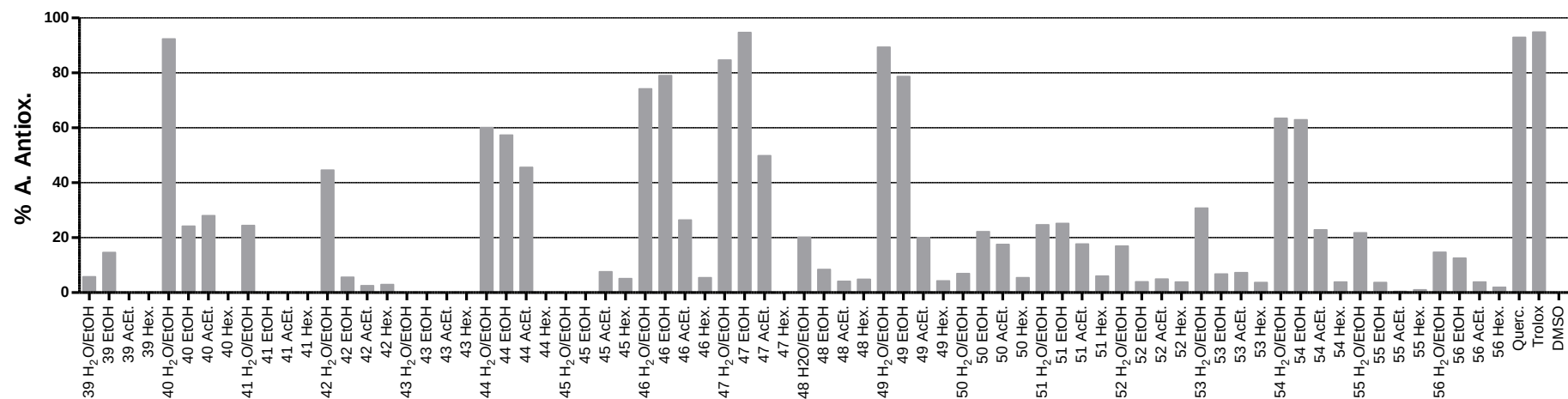


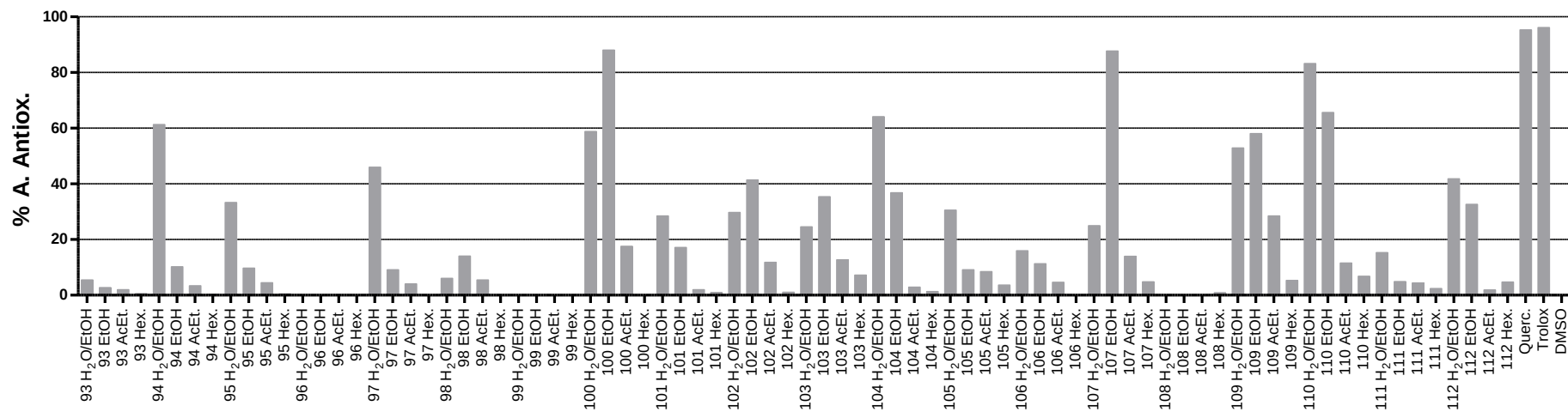
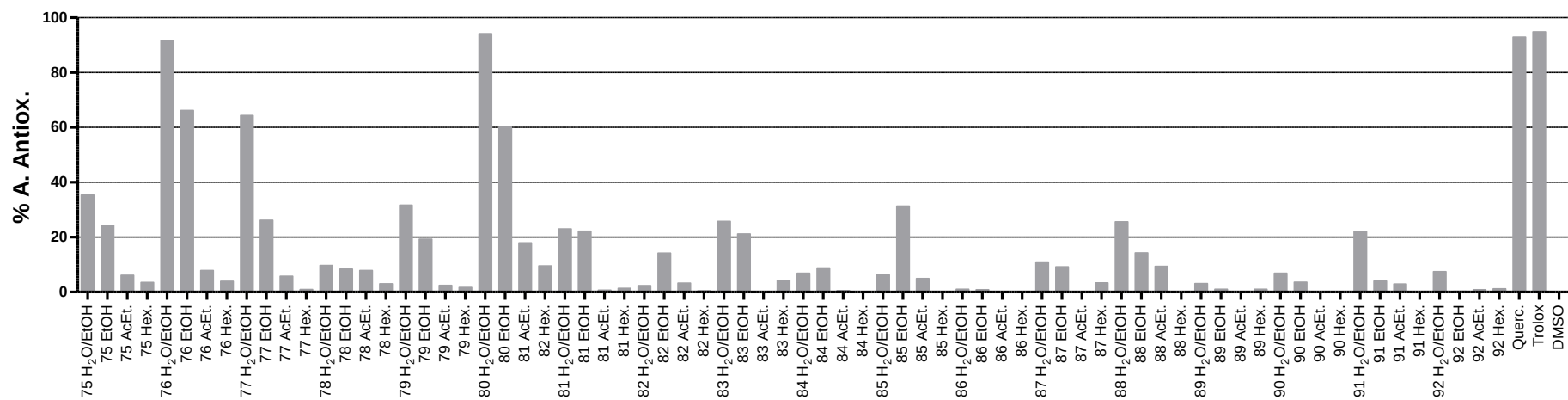


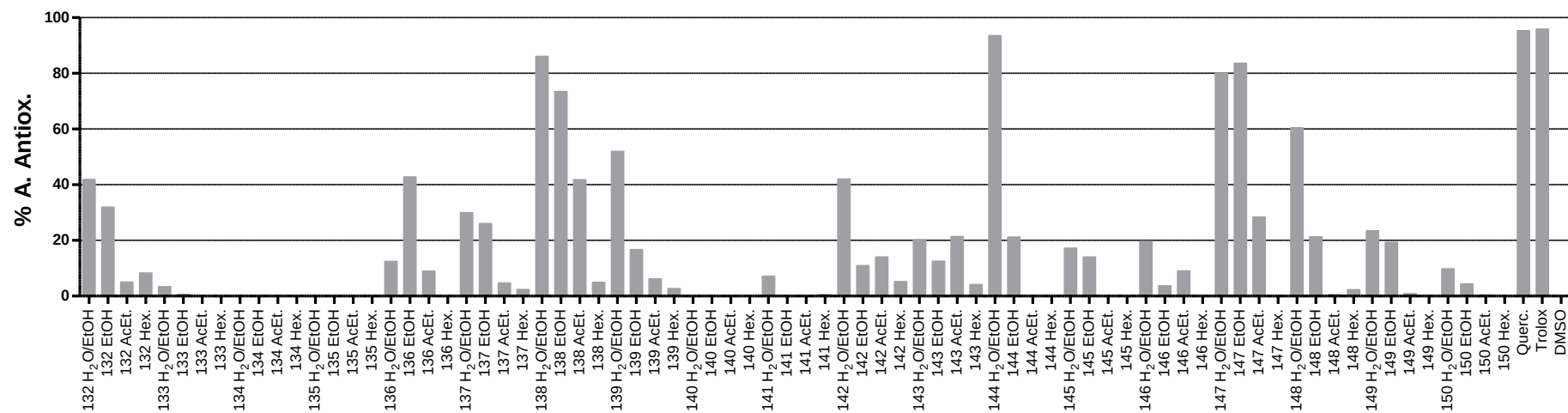
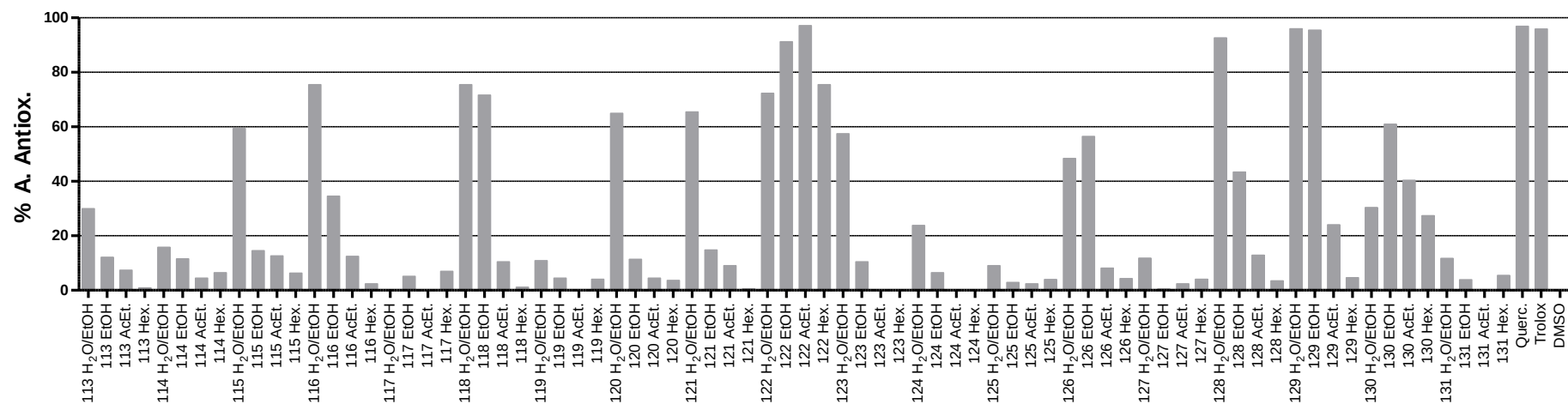
RESULTADOS DPPH: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

RÉSULTATS DPPH: REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES POURCENTAGES D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE









M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
1 H ₂ O/ EtOH	94.23 ± 0.01	9.17 ± 0.14	0.89 ± 0.05	12.82 ± 0.04	0.72 ± 0.10	96.88 ± 0.01		79.98 ± 0.05
1 EtOH	64.48 ± 0.21	5.06 ± 0.11	1.29 ± 0.06			72.46 ± 0.31		98.08 ± 0.01
1 AcEt.	40.81 ± 0.01	1.55 ± 0.05	0.78 ± 0.16			25.42 ± 0.72		95.18 ± 0.02
1 Hex.	7.56 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.51 ± 0.01		1.69 ± 0.03	98.77 ± 0.01		
2 H ₂ O/EtOH	21.61 ± 0.02	0.99 ± 0.03	0.67 ± 0.03			44.34 ± 0.01		
2 EtOH	9.54 ± 0.03	0.99 ± 0.02	1.14 ± 0.01			70.34 ± 0.02		
2 AcEt.	0.32 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.49 ± 0.02		2.17 ± 0.01	47.43 ± 0.01		41.09 ± 0.02
2 Hex.	0.02 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.35 ± 0.01		3.38 ± 0.02	50.88 ± 0.01		
3 H ₂ O/EtOH	56.61 ± 0.05	2.66 ± 0.08	0.65 ± 0.01	2.41 ± 0.03	2.17 ± 0.13	28.76 ± 0.01		
3 EtOH	11.84 ± 0.02	0.96 ± 0.07	0.74 ± 0.04			75.75 ± 0.01		16.24 ± 0.12
3 AcEt.		0.25 ± 0.04	0.43 ± 0.01		2.21 ± 0.03	54.22 ± 0.12		15.02 ± 0.09
3 Hex.	1.02 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.01		1.83 ± 0.03	26.47 ± 0.01		
4 H ₂ O/EtOH		0.29 ± 0.03	0.16 ± 0.08				1.14 ± 6.54	
4 EtOH		0.21 ± 0.01	0.55 ± 0.01			26.93 ± 0.01		
4 AcEt.		0.12 ± 0.01	0.41 ± 0.01		4.66 ± 0.01			26.19 ± 0.02
4 Hex.		0.05 ± 0.01	0.21 ± 0.01	14.43 ± 0.02		10.52 ± 0.09	2.71 ± 0.88	2.98 ± 0.24
5 H ₂ O/EtOH		0.32 ± 0.01	0.14 ± 0.09	7.82 ± 0.04	3.92 ± 0.13			
5 EtOH		0.11 ± 0.02	0.33 ± 0.01			9.96 ± 0.01	1.81 ± 0.75	
5 AcEt.		0.03 ± 0.01	0.21 ± 0.01	12.67 ± 0.02	1.07 ± 0.02		5.26 ± 0.13	18.12 ± 0.03
5 Hex.	0.53 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.29 ± 0.01			4.52 ± 0.03	0.03 ± 0.01	
6 H ₂ O/EtOH		0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.01			29.64 ± 0.02		
6 EtOH	17.82 ± 0.02	1.57 ± 0.04	0.63 ± 0.16			39.86 ± 0.02		
6 AcEt.	0.02 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.06		3.58 ± 0.01	52.62 ± 0.01		20.99 ± 0.01
6 Hex.	0.07 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.01		1.05 ± 0.02	30.43 ± 0.02		
7 H ₂ O/EtOH	18.53 ± 0.02	1.03 ± 0.03	0.38 ± 0.01					
7 EtOH		0.32 ± 0.02	0.41 ± 0.01			28.50 ± 0.02		
7 AcEt.		0.12 ± 0.01	0.33 ± 0.02		0.58 ± 0.03	29.42 ± 0.01		
7 Hex.	1.81 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.26 ± 0.01	2.72 ± 0.06				
8 H ₂ O/EtOH	21.57 ± 0.07	1.77 ± 0.23	0.42 ± 0.01			42.24 ± 0.01		2.38 ± 0.19
8 EtOH	1.66 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.73 ± 0.09		4.96 ± 0.03	25.16 ± 0.03		8.53 ± 0.05
8 AcEt.		0.19 ± 0.02	0.35 ± 0.04		3.15 ± 0.02	9.91 ± 0.02	6.46 ± 4.52	2.28 ± 0.01
8 Hex.		0.07 ± 0.01	0.19 ± 0.01		4.51 ± 0.03		12.38 ± 2.21	0.04 ± 0.02
9 H ₂ O/EtOH		0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01					-
9 EtOH	18.30 ± 0.04	1.87 ± 0.10	1.05 ± 0.01		5.52 ± 0.02	23.91 ± 0.03	15.06 ± 8.47	2.39 ± 0.06
9 AcEt.	6.46 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.01		3.65 ± 0.03		4.32 ± 0.12	0.67 ± 0.03
9 Hex.	4.68 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.25 ± 0.01		3.71 ± 0.03	1.19 ± 0.04	4.02 ± 0.91	

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
10 H ₂ O/EtOH								
10 EtOH	7.46 ± 0.06	0.81 ± 0.02	0.81 ± 0.03		4.14 ± 0.03	13.21 ± 0.03		0.54 ± 0.04
10 AcEt.	5.13 ± 0.08	0.08 ± 0.02	0.23 ± 0.01		2.95 ± 0.03		6.64 ± 0.89	
10 Hex.	3.93 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.28 ± 0.01		3.14 ± 0.02	3.39 ± 0.03	4.18 ± 0.16	
11 H ₂ O/EtOH	13.82 ± 0.02	1.25 ± 0.04	0.46 ± 0.01		4.69 ± 0.03	5.99 ± 0.02		
11 EtOH	7.16 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.92 ± 0.03		3.57 ± 0.02	11.14 ± 0.07		
11 AcEt.	9.71 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.53 ± 0.02		4.79 ± 0.03	3.87 ± 0.01	3.96 ± 0.81	2.12 ± 0.01
11 Hex.	3.92 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.24 ± 0.07		2.15 ± 0.01		3.92 ± 0.96	
12 H ₂ O/EtOH	17.38 ± 0.04	1.59 ± 0.05	0.90 ± 0.05		6.14 ± 0.02	3.29 ± 0.03		0.77 ± 0.02
12 EtOH	6.23 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.49 ± 0.02		6.31 ± 0.01			
12 AcEt.	5.02 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.51 ± 0.01		7.97 ± 0.03			
12 Hex.	5.41 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.41 ± 0.02		7.68 ± 0.02	0.16 ± 0.01		
13 H ₂ O/EtOH	57.93 ± 0.01	5.66 ± 0.22	0.23 ± 0.01	3.04 ± 0.02	6.17 ± 0.03	49.05 ± 0.06	9.14 ± 0.11	39.22 ± 0.07
13 EtOH	33.59 ± 0.02	2.09 ± 0.07	0.75 ± 0.12		6.02 ± 0.02	75.75 ± 0.02		46.03 ± 0.29
13 AcEt.	8.58 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.75 ± 0.04		4.43 ± 0.04	34.74 ± 0.11		0.71 ± 0.02
13 Hex.	1.52 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.53 ± 0.03		7.46 ± 0.03	81.81 ± 0.05		1.38 ± 0.05
14 H ₂ O/EtOH	92.77 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.61 ± 0.01		8.57 ± 0.03	82.25 ± 0.05		5.75 ± 0.01
14 EtOH	75.17 ± 0.09	6.78 ± 0.39	0.54 ± 0.17		5.52 ± 0.02	100.67 ± 0.01	3.63 ± 0.57	26.02 ± 0.25
14 AcEt.	14.22 ± 0.06	0.67 ± 0.03	0.41 ± 0.26		3.11 ± 0.02	99.16 ± 0.01		3.18 ± 0.07
14 Hex.	2.44 ± 0.05	0.28 ± 0.02	0.43 ± 0.02		6.78 ± 0.02	48.76 ± 0.03		1.46 ± 0.05
15 H ₂ O/EtOH	58.79 ± 0.07	5.79 ± 0.21	1.29 ± 0.52		5.32 ± 0.02	26.72 ± 0.08		2.89 ± 0.02
15 EtOH	26.68 ± 0.04	2.53 ± 0.07	0.95 ± 0.18		0.79 ± 0.01	72.59 ± 0.07		0.53 ± 0.04
15 AcEt.		0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.13		1.31 ± 0.01	62.48 ± 0.15		9.35 ± 0.07
15 Hex.	2.19 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01			3.93 ± 0.02	4.26 ± 0.87	
16 H ₂ O/EtOH	73.97 ± 0.01	4.97 ± 0.15	0.85 ± 0.25		4.23 ± 0.01	17.47 ± 0.01		
16 EtOH	41.62 ± 0.01	2.89 ± 0.08	0.61 ± 0.05		5.76 ± 0.02	64.76 ± 0.05		21.15 ± 0.14
16 AcEt.	0.61 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.54 ± 0.01		2.72 ± 0.02	24.16 ± 0.08	5.66 ± 4.08	8.98 ± 0.05
16 Hex.	5.61 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01		2.56 ± 0.02	19.37 ± 0.06	3.19 ± 0.97	
17 H ₂ O/EtOH	57.34 ± 0.01	4.64 ± 0.13	3.56 ± 0.12		4.79 ± 0.02	37.71 ± 0.04	9.15 ± 5.07	
17 EtOH	44.56 ± 0.03	4.19 ± 0.18	3.48 ± 0.06		3.16 ± 0.02	44.58 ± 0.06	16.86 ± 12.21	30.02 ± 0.15
17 AcEt.	6.22 ± 0.01	1.25 ± 0.04	0.55 ± 0.14			48.08 ± 0.02	5.02 ± 0.91	30.02 ± 0.07
17 Hex.	2.14 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02		6.22 ± 0.03	2.13 ± 0.02	3.82 ± 0.94	

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
18 H ₂ O/EtOH	73.91 ± 0.03	5.03 ± 0.15	0.56 ± 0.12			72.03 ± 0.03	5.83 ± 0.96	
18 EtOH	70.48 ± 0.02	4.83 ± 0.21	1.21 ± 0.13		1.77 ± 0.03	97.89 ± 0.01		26.29 ± 0.13
18 AcEt.	36.41 ± 0.07	1.72 ± 0.41	0.14 ± 0.17		3.94 ± 0.01	97.51 ± 0.03	28.97 ± 2.73	17.45 ± 0.04
18 Hex.	0.76 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.02		9.94 ± 0.02		6.27 ± 4.31	
19 H ₂ O/EtOH	49.59 ± 0.02	3.07 ± 0.08	0.44 ± 0.28		10.03 ± 0.01	27.93 ± 0.18		
19 EtOH	41.46 ± 0.09	3.02 ± 0.04	1.45 ± 0.04		9.44 ± 0.01	44.23 ± 0.06		31.19 ± 0.11
19 AcEt.	4.88 ± 0.01	0.54 ± 0.10	0.36 ± 0.03		11.78 ± 0.02	29.83 ± 0.04	6.81 ± 0.15	19.94 ± 0.09
19 Hex.	10.99 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01		6.55 ± 0.02	12.34 ± 0.02	3.86 ± 0.98	
20 H ₂ O/EtOH	87.35 ± 0.01	6.16 ± 0.17	2.75 ± 0.18		37.81 ± 0.01	44.97 ± 0.46		
20 EtOH	58.97 ± 0.01	3.14 ± 0.18	1.03 ± 0.22		25.95 ± 0.04	45.48 ± 0.28		8.51 ± 0.31
20 AcEt.	1.58 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.16 ± 0.05		7.07 ± 0.02	25.35 ± 0.17	4.49 ± 0.16	1.34 ± 0.09
20 Hex.	6.69 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01			5.04 ± 0.01	2.34 ± 0.55	
21 H ₂ O/EtOH	90.68 ± 0.01	0.08 ± 0.01	3.06 ± 0.08		32.72 ± 0.02	73.28 ± 0.01		2.45 ± 0.01
21 EtOH	83.52 ± 0.01	7.53 ± 0.48	1.69 ± 0.09		1.17 ± 0.02	95.34 ± 0.06		20.36 ± 0.12
21 AcEt.	22.94 ± 0.03	1.93 ± 0.03	0.51 ± 0.05		7.59 ± 0.03	45.74 ± 0.07	0.35 ± 0.06	7.31 ± 0.11
21 Hex.	3.84 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.31 ± 0.01			1.73 ± 0.02	4.18 ± 0.78	
22 H ₂ O/EtOH	95.89 ± 0.01	0.09 ± 0.01	3.07 ± 0.13		12.19 ± 0.01	91.53 ± 0.07		3.47 ± 0.02
22 EtOH	92.31 ± 0.01	5.03 ± 0.12	1.64 ± 0.03		8.71 ± 0.02	98.34 ± 0.01		12.34 ± 0.03
22 AcEt.	38.56 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.54 ± 0.02		0.43 ± 0.03	65.92 ± 0.23		2.33 ± 0.04
22 Hex.	9.65 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.39 ± 0.02			42.01 ± 0.01		
23 H ₂ O/EtOH	56.88 ± 0.04	3.83 ± 0.16	0.99 ± 0.03		28.34 ± 0.02	19.76 ± 0.03		11.35 ± 0.19
23 EtOH		1.27 ± 0.05	1.17 ± 0.04			56.47 ± 0.04		64.84 ± 0.03
23 AcEt.		0.25 ± 0.02	0.36 ± 0.03		2.51 ± 0.01	34.71 ± 0.11	20.57 ± 0.25	53.14 ± 0.07
23 Hex.		0.18 ± 0.01	0.57 ± 0.02			20.43 ± 0.08		8.23 ± 0.17
24 H ₂ O/EtOH		1.21 ± 0.04	0.55 ± 0.03		29.68 ± 0.04	8.88 ± 0.02		30.84 ± 0.06
24 EtOH		0.91 ± 0.03	0.51 ± 0.25		25.12 ± 0.03	27.57 ± 0.11		24.41 ± 0.08
24 AcEt.		0.02 ± 0.01	0.29 ± 0.01		11.66 ± 0.02	3.61 ± 0.04	16.92 ± 0.26	33.59 ± 0.04
24 Hex.		0.23 ± 0.01	0.42 ± 0.03			2.79 ± 0.04		11.91 ± 0.06
25 H ₂ O/EtOH		6.71 ± 0.12	2.26 ± 0.01		29.35 ± 0.02	71.62 ± 0.02		
25 EtOH	46.53 ± 0.04	4.11 ± 0.15	1.29 ± 0.05		19.74 ± 0.03	94.34 ± 0.01	100.00 ± 30.11	67.57 ± 0.04
25 AcEt.		1.31 ± 0.02	0.44 ± 0.02		7.16 ± 0.01	90.09 ± 0.06	1.63 ± 0.28	30.63 ± 0.05
25 Hex.		0.15 ± 0.01	0.45 ± 0.01		1.18 ± 0.04	43.69 ± 0.06		14.55 ± 0.06
26 H ₂ O/EtOH	57.92 ± 0.13		1.84 ± 0.05		32.37 ± 0.03	47.52 ± 0.19		33.56 ± 0.12
26 EtOH	8.91 ± 0.04	1.52 ± 0.05	0.72 ± 0.03		29.23 ± 0.03	15.67 ± 0.02	2.82 ± 0.12	30.95 ± 0.07
26 AcEt.		0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.01	5.51 ± 0.01	18.81 ± 0.03		10.86 ± 0.18	
26 Hex.		0.16 ± 0.01	0.34 ± 0.01		8.63 ± 0.05	2.51 ± 0.04		1.53 ± 0.06

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flavo. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
27 H ₂ O/EtOH	65.69 ± 0.07		2.24 ± 0.04		35.91 ± 0.02	87.44 ± 0.01	90.28 ± 22.34	75.76 ± 0.03
27 EtOH	83.71 ± 0.01	6.92 ± 0.22	2.26 ± 0.06		29.17 ± 0.01	92.76 ± 0.01	21.26 ± 0.82	75.12 ± 0.01
27 AcEt.	0.11 ± 0.01	1.15 ± 0.03	0.78 ± 0.03		10.86 ± 0.03	63.57 ± 0.03	23.04 ± 16.47	75.61 ± 0.01
27 Hex.		0.21 ± 0.01	0.38 ± 0.02		7.11 ± 0.03	17.94 ± 0.08		11.91 ± 0.05
28 H ₂ O/EtOH		1.09 ± 0.03	0.56 ± 0.02		1.03 ± 0.03			
28 EtOH		0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.05		0.28 ± 0.02	3.83 ± 0.04		
28 AcEt.		0.53 ± 0.04	0.71 ± 0.02		2.38 ± 0.05	10.45 ± 0.17		
28 Hex.		0.19 ± 0.01	0.35 ± 0.01			3.88 ± 0.04		
29 H ₂ O/EtOH		6.89 ± 0.14	2.76 ± 1.07		34.05 ± 0.02	34.18 ± 0.05		6.92 ± 0.06
29 EtOH	41.41 ± 0.03	3.17 ± 0.11	1.75 ± 0.17		6.83 ± 0.05	89.28 ± 0.01		12.02 ± 0.05
29 AcEt.		1.02 ± 0.02	0.81 ± 0.20			80.25 ± 0.02	0.03 ± 0.01	10.43 ± 0.01
29 Hex.		0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.02			31.72 ± 0.09		20.66 ± 0.14
30 H ₂ O/EtOH		1.18 ± 0.03	0.29 ± 0.01	2.42 ± 0.01	29.31 ± 0.02	8.44 ± 0.02		2.75 ± 0.05
30 EtOH		1.39 ± 0.04	0.62 ± 0.32		5.71 ± 0.03	41.87 ± 0.07		25.62 ± 0.05
30 AcEt.	5.67 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01		2.33 ± 0.04	39.58 ± 0.04		39.47 ± 0.09
30 Hex.	5.11 ± 0.05	0.11 ± 0.02	0.38 ± 0.01		3.02 ± 0.03	23.08 ± 0.01		3.83 ± 0.03
31 H ₂ O/EtOH	11.37 ± 0.02	0.95 ± 0.05	0.18 ± 0.03	3.81 ± 0.01	1.63 ± 0.04	0.88 ± 0.02		
31 EtOH	10.23 ± 0.06	0.13 ± 0.01	0.34 ± 0.15		6.13 ± 0.04	0.69 ± 0.02		8.04 ± 0.09
31 AcEt.	1.14 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.01		7.04 ± 0.03	12.35 ± 0.02	0.97 ± 0.07	12.64 ± 0.04
31 Hex.	0.99 ± 0.05	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.01		3.52 ± 0.04	7.25 ± 0.01	1.83 ± 0.08	
32 H ₂ O/EtOH	6.11 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.19 ± 0.01		2.57 ± 0.02			
32 EtOH	4.07 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.34 ± 0.08		4.47 ± 0.03		1.28 ± 0.01	3.46 ± 0.01
32 AcEt.	5.52 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.29 ± 0.03		5.34 ± 0.04	8.02 ± 0.01		16.39 ± 0.11
32 Hex.	9.82 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.29 ± 0.01		4.16 ± 0.04	11.95 ± 0.03		
33 H ₂ O/EtOH	36.09 ± 0.13	2.89 ± 0.16	1.82 ± 0.09	6.41 ± 0.01	2.11 ± 0.03	7.54 ± 0.15		
33 EtOH	19.19 ± 0.02	0.96 ± 0.03	1.02 ± 0.31		3.47 ± 0.03	92.32 ± 0.03		2.29 ± 0.03
33 AcEt.	0.07 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.48 ± 0.01		2.67 ± 0.02	89.15 ± 0.16	1.75 ± 0.05	3.25 ± 0.07
33 Hex.	1.85 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.35 ± 0.01		3.67 ± 0.03	56.78 ± 0.03		
34 H ₂ O/EtOH	96.01 ± 0.01		2.34 ± 0.04	14.15 ± 0.03	26.04 ± 0.04	95.18 ± 0.02		58.43 ± 0.85
34 EtOH	95.61 ± 0.01	7.68 ± 0.13	2.34 ± 0.02	7.61 ± 0.01	13.92 ± 0.03	60.26 ± 0.16		13.16 ± 0.03
34 AcEt.	45.38 ± 0.21	1.83 ± 0.02	0.84 ± 0.13		3.35 ± 0.03	34.16 ± 0.04		21.47 ± 0.02
34 Hex.	8.75 ± 0.02		0.29 ± 0.01		1.69 ± 0.03	5.32 ± 0.03	3.91 ± 0.76	1.89 ± 0.08
35 H ₂ O/EtOH	15.08 ± 0.03	1.01 ± 0.02	0.52 ± 0.03		3.49 ± 0.03	2.65 ± 0.08		
35 EtOH	5.14 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.92 ± 0.04		4.86 ± 0.04	18.69 ± 0.03		14.33 ± 0.02
35 AcEt.	2.51 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.75 ± 0.03		6.21 ± 0.02	17.33 ± 0.05		13.53 ± 0.06
35 Hex.	1.53 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.62 ± 0.11		2.86 ± 0.03	11.61 ± 0.05		8.66 ± 0.04

M/E	DPPH % A Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
36 H ₂ O/EtOH		1.34 ± 0.04	0.59 ± 0.12		2.31 ± 0.01	17.67 ± 0.03		
36 EtOH		0.31 ± 0.03	0.67 ± 0.03		3.54 ± 0.02	16.64 ± 0.01		3.14 ± 0.03
36 AcEt.		0.18 ± 0.01	0.48 ± 0.04		3.83 ± 0.04			5.22 ± 0.05
36 Hex.		0.03 ± 0.01	0.32 ± 0.01		2.58 ± 0.03	5.22 ± 0.05	1.12 ± 0.77	4.64 ± 0.06
37 H ₂ O/EtOH	28.83 ± 0.04	1.56 ± 0.05	1.08 ± 0.02		2.08 ± 0.03	15.26 ± 0.03		
37 EtOH	2.82 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.72 ± 0.02		7.61 ± 0.03	24.37 ± 0.03		6.61 ± 0.04
37 AcEt.		0.16 ± 0.01	0.51 ± 0.01			11.47 ± 0.04	13.14 ± 1.36	
37 Hex.		0.07 ± 0.01	0.45 ± 0.02			7.81 ± 0.02	11.05 ± 3.89	
38 H ₂ O/EtOH		0.68 ± 0.01	0.41 ± 0.01			6.32 ± 0.01	7.81 ± 0.32	
38 EtOH		0.21 ± 0.01	0.55 ± 0.02	1.91 ± 0.02		16.52 ± 0.02	-	
38 AcEt.		0.05 ± 0.01	0.53 ± 0.02			12.42 ± 0.03	20.76 ± 0.53	
38 Hex.		0.06 ± 0.01	0.34 ± 0.01			8.85 ± 0.04		
39 H ₂ O/EtOH	5.79 ± 0.04	1.97 ± 0.09	0.82 ± 0.10			65.23 ± 0.02	15.09 ± 0.01	4.58 ± 0.04
39 EtOH	14.59 ± 0.05	1.85 ± 0.08	1.06 ± 0.12			59.16 ± 0.01	19.89 ± 0.02	70.79 ± 0.03
39 AcEt.		0.63 ± 0.03	0.66 ± 0.04		5.11 ± 0.03	67.72 ± 0.03	8.26 ± 1.50	85.55 ± 0.05
39 Hex.		0.11 ± 0.01	0.47 ± 0.03			15.35 ± 0.03	27.24 ± 4.15	
40 H ₂ O/EtOH	92.34 ± 0.01		5.18 ± 0.40			91.53 ± 0.01		
40 EtOH	24.21 ± 0.14	3.18 ± 0.08	1.47 ± 0.16	2.97 ± 0.01		85.29 ± 0.06		
40 AcEt.	28.05 ± 0.02	2.54 ± 0.02	1.31 ± 0.03			91.14 ± 0.05		26.52 ± 0.03
40 Hex.		0.12 ± 0.01	0.35 ± 0.06			14.07 ± 0.02	25.43 ± 3.77	1.65 ± 0.01
41 H ₂ O/EtOH	24.44 ± 0.05	0.42 ± 0.02	0.18 ± 0.01				34.85 ± 3.35	
41 EtOH		0.18 ± 0.01	0.41 ± 0.01			1.49 ± 0.06		
41 AcEt.		0.74 ± 0.02	0.44 ± 0.02			26.75 ± 0.03		
41 Hex.		0.11 ± 0.01	0.26 ± 0.01		1.02 ± 0.04	4.37 ± 0.02		
42 H ₂ O/EtOH	44.65 ± 0.04	4.22 ± 0.17	0.69 ± 0.02			40.46 ± 0.18		40.08 ± 0.02
42 EtOH	5.62 ± 0.04	1.03 ± 0.03	0.87 ± 0.06			28.23 ± 0.09		
42 AcEt.	2.58 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.48 ± 0.17			42.71 ± 0.06		9.38 ± 0.02
42 Hex.	2.95 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.32 ± 0.01		0.57 ± 0.04	17.48 ± 0.02		35.47 ± 0.03
43 H ₂ O/EtOH		1.38 ± 0.04	0.54 ± 0.01			1.83 ± 0.03		
43 EtOH		0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.08			19.76 ± 0.01		
43 AcEt.		0.14 ± 0.01	0.48 ± 0.03			30.72 ± 0.04		
43 Hex.		0.06 ± 0.01	0.27 ± 0.01		0.29 ± 0.03	7.51 ± 0.02		
44 H ₂ O/EtOH	60.13 ± 0.03	1.19 ± 0.17	0.84 ± 0.01		5.92 ± 0.03	78.32 ± 0.03		
44 EtOH	57.34 ± 0.06	2.57 ± 0.11	1.08 ± 0.04	3.83 ± 0.01		63.45 ± 0.03		
44 AcEt.	45.62 ± 0.02	0.88 ± 0.04	0.59 ± 0.03			87.98 ± 0.08		
44 Hex.		0.05 ± 0.01	0.23 ± 0.01			22.35 ± 0.02	18.87 ± 4.61	

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
45 H ₂ O/EtOH		0.35 ± 0.01	0.27 ± 0.01				13.09 ± 6.33	
45 EtOH		0.54 ± 0.01	0.74 ± 0.05			12.71 ± 0.04	8.43 ± 6.71	
45 AcEt.	7.62 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.45 ± 0.03			15.52 ± 0.01	56.07 ± 9.38	
45 Hex.	5.16 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.29 ± 0.01			1.57 ± 0.02	15.06 ± 12.14	
46 H ₂ O/EtOH	74.23 ± 0.05	4.27 ± 0.04	4.98 ± 0.16			31.01 ± 0.03		
46 EtOH	79.04 ± 0.03	4.46 ± 0.12	5.54 ± 0.19			71.36 ± 0.04	14.13 ± 1.82	10.72 ± 0.30
46 AcEt.	26.46 ± 0.04	1.25 ± 0.03	1.39 ± 0.09			51.48 ± 0.05	13.38 ± 1.73	51.19 ± 0.17
46 Hex.	5.48 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.36 ± 0.01			29.53 ± 0.03	6.91 ± 1.55	
47 H ₂ O/EtOH	84.74 ± 0.14		1.84 ± 0.06			104.53 ± 0.01		
47 EtOH	94.73 ± 0.01		1.70 ± 0.21			103.11 ± 0.01		
47 AcEt.	49.89 ± 0.07	1.39 ± 0.09	0.72 ± 0.11			101.16 ± 0.01	2.19 ± 1.44	
47 Hex.		0.03 ± 0.01	0.26 ± 0.02			5.16 ± 0.02	17.18 ± 11.37	
48 H ₂ O/EtOH	20.21 ± 0.04	1.23 ± 0.01	0.55 ± 0.01				4.25 ± 1.76	
48 EtOH	8.42 ± 0.01	0.77 ± 0.05	0.84 ± 0.06			14.81 ± 0.04	3.77 ± 1.54	
48 AcEt.	4.13 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.40 ± 0.02			55.83 ± 0.03	11.03 ± 8.64	
48 Hex.	4.86 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.38 ± 0.02			41.55 ± 0.04	13.35 ± 1.43	
49 H ₂ O/EtOH	89.38 ± 0.03		2.28 ± 0.25			87.16 ± 0.01		
49 EtOH	78.72 ± 0.04	6.21 ± 0.12	2.03 ± 0.05			102.76 ± 0.01		71.44 ± 0.45
49 AcEt.	20.07 ± 0.09	1.43 ± 0.03	1.01 ± 0.04	3.61 ± 0.02		102.81 ± 0.01	1.52 ± 0.15	89.79 ± 0.12
49 Hex.	4.27 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.31 ± 0.01			37.15 ± 0.13	18.82 ± 13.49	
50 H ₂ O/EtOH	6.98 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.24 ± 0.01				17.47 ± 5.52	
50 EtOH	22.19 ± 0.03	1.38 ± 0.02	0.74 ± 0.04			49.98 ± 0.04	28.25 ± 14.65	43.45 ± 0.27
50 AcEt.	17.58 ± 0.05	0.76 ± 0.03	0.31 ± 0.04		3.46 ± 0.06	62.15 ± 0.03	15.34 ± 3.24	60.83 ± 0.11
50 Hex.	5.48 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.35 ± 0.01			22.88 ± 0.03	4.47 ± 0.52	
51 H ₂ O/EtOH	24.72 ± 0.05	2.20 ± 0.09	0.43 ± 0.03		2.04 ± 0.06	7.11 ± 0.15	6.07 ± 0.61	
51 EtOH	25.18 ± 0.07	5.13 ± 0.10	0.59 ± 0.08			94.98 ± 0.01	2.37 ± 0.48	
51 AcEt.	17.68 ± 0.05	4.34 ± 0.13	0.36 ± 0.11			88.29 ± 0.03		
51 Hex.	6.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.01		2.33 ± 0.15	25.07 ± 0.03	6.97 ± 0.86	
52 H ₂ O/EtOH	16.92 ± 0.02	1.42 ± 0.06	0.45 ± 0.15					2.59 ± 0.01
52 EtOH	3.94 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.04			8.72 ± 0.04		19.77 ± 0.19
52 AcEt.	4.92 ± 0.02	0.24 ± 0.06	0.30 ± 0.07			49.62 ± 0.05	97.12 ± 0.73	7.66 ± 0.14
52 Hex.	3.86 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.43 ± 0.01			59.97 ± 0.05		
53 H ₂ O/EtOH	30.81 ± 0.02	2.38 ± 0.04	0.57 ± 0.04			5.09 ± 0.01		0.72 ± 0.04
53 EtOH	6.78 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.57 ± 0.07			39.04 ± 0.03		2.25 ± 0.04
53 AcEt.	7.26 ± 0.03	0.54 ± 0.01	0.66 ± 0.09			49.46 ± 0.12		0.68 ± 0.01
53 Hex.	3.71 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.02			17.51 ± 0.07		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
54 H ₂ O/EtOH	63.47 ± 0.03	3.68 ± 0.02	1.89 ± 0.06			27.61 ± 0.03		
54 EtOH	62.94 ± 0.08	3.84 ± 0.08	3.14 ± 0.06			79.59 ± 0.01	8.31 ± 1.01	3.56 ± 0.01
54 AcEt.	22.91 ± 0.04	0.94 ± 0.02	0.81 ± 0.01			40.56 ± 0.11	5.52 ± 0.63	
54 Hex.	3.88 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.46 ± 0.04			28.04 ± 0.13		
55 H ₂ O/EtOH	21.76 ± 0.07	1.60 ± 0.03	0.73 ± 0.01					
55 EtOH	3.71 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.77 ± 0.09			66.82 ± 0.04	3.06 ± 2.06	8.42 ± 0.06
55 AcEt.	0.47 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.42 ± 0.01			18.69 ± 0.04	3.46 ± 1.11	
55 Hex.	1.02 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.32 ± 0.01			16.37 ± 0.17	9.43 ± 5.33	
56 H ₂ O/EtOH	14.67 ± 0.06	1.53 ± 0.02	0.23 ± 0.02		7.43 ± 0.06	0.84 ± 0.047		
56 EtOH	12.51 ± 0.04	0.35 ± 0.01	0.79 ± 0.07			58.41 ± 0.23		3.95 ± 0.12
56 AcEt.	3.91 ± 0.02	1.38 ± 0.02	0.32 ± 0.01			19.71 ± 0.06	1.03 ± 0.15	
56 Hex.	1.93 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.28 ± 0.01			19.21 ± 0.15	4.81 ± 1.27	
57 H ₂ O/EtOH	92.78 ± 0.01		3.47 ± 0.24		3.18 ± 0.07	27.15 ± 0.04		4.68 ± 0.02
57 EtOH	93.71 ± 0.01	5.58 ± 0.23	4.33 ± 0.17		26.09 ± 0.06	82.75 ± 0.02		7.94 ± 0.02
57 AcEt.	80.42 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.94 ± 0.20		6.89 ± 0.05	51.79 ± 0.07		4.27 ± 0.03
57 Hex.			0.31 ± 0.05			36.19 ± 0.12	4.65 ± 1.22	4.62 ± 0.05
58 H ₂ O/EtOH	66.68 ± 0.38	6.41 ± 0.10	0.95 ± 0.02		2.06 ± 0.07	80.07 ± 0.01	30.36 ± 3.92	7.32 ± 0.03
58 EtOH	74.52 ± 0.08	1.23 ± 0.03	0.67 ± 0.09			99.73 ± 0.01	53.87 ± 8.24	63.35 ± 0.07
58 AcEt.	18.83 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.51 ± 0.15			99.10 ± 0.01	4.57 ± 0.57	3.49 ± 0.01
58 Hex.		0.54 ± 0.01	0.29 ± 0.01			23.85 ± 0.13		
59 H ₂ O/EtOH	5.75 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.18 ± 0.01		4.08 ± 0.03		1.53 ± 0.78	
59 EtOH	9.89 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.20 ± 0.03			42.69 ± 0.67	6.95 ± 1.06	3.18 ± 0.03
59 AcEt.	1.45 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.04			1.26 ± 0.04	97.75 ± 6.01	3.21 ± 0.04
59 Hex.		3.85 ± 0.38	0.25 ± 0.01		14.26 ± 0.03		7.78 ± 0.91	
60 H ₂ O/EtOH	38.29 ± 0.08	1.60 ± 0.04	1.48 ± 0.03			14.03 ± 0.03		1.31 ± 0.04
60 EtOH	18.54 ± 0.06	0.26 ± 0.02	0.97 ± 0.04			16.17 ± 0.76	18.09 ± 9.74	1.29 ± 0.03
60 AcEt.	1.61 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.49 ± 0.02				9.71 ± 7.67	41.54 ± 0.46
60 Hex.		6.33 ± 0.29	0.34 ± 0.01				9.57 ± 1.57	
61 H ₂ O/EtOH	78.86 ± 0.03	1.93 ± 0.02	1.05 ± 0.01		0.33 ± 0.02	26.06 ± 0.01	18.48 ± 11.35	60.59 ± 0.08
61 EtOH	26.77 ± 0.02	1.11 ± 0.06	0.92 ± 0.06			29.59 ± 0.65	11.03 ± 10.96	27.56 ± 0.03
61 AcEt.	9.81 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.82 ± 0.06					56.93 ± 0.28
61 Hex.	12.21 ± 0.18		0.42 ± 0.05				9.91 ± 0.11	30.49 ± 0.11
62 H ₂ O/EtOH	92.75 ± 0.01	1.12 ± 0.02	0.51 ± 0.01		9.93 ± 0.01	6.67 ± 0.01		4.93 ± 0.03
62 EtOH	22.16 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.01			13.33 ± 0.75	16.89 ± 7.47	4.97 ± 0.034
62 AcEt.	8.04 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.34 ± 0.02				22.56 ± 17.26	6.37 ± 0.11
62 Hex.			9.88 ± 0.02		3.04 ± 0.02		0.85 ± 0.02	

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
63 H ₂ O/EtOH	94.39 ± 0.01	4.97 ± 0.11	0.65 ± 0.02	5.19 ± 0.01	28.46 ± 0.18	48.22 ± 0.01		47.41 ± 0.03
63 EtOH	89.62 ± 0.01		0.69 ± 0.08		20.22 ± 0.10	98.24 ± 0.14		60.67 ± 0.05
63 AcEt.	53.79 ± 0.06	2.31 ± 0.07	0.63 ± 0.07			16.34 ± 0.07		52.08 ± 0.04
63 Hex.	1.09 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01				7.91 ± 0.14	
64 H ₂ O/EtOH	94.33 ± 0.01		1.27 ± 0.08		20.43 ± 0.03	100.00 ± 0.01		4.39 ± 0.05
64 EtOH	94.85 ± 0.01		0.68 ± 0.01		8.47 ± 0.04	72.04 ± 0.21		9.08 ± 0.03
64 AcEt.	41.72 ± 0.31	1.33 ± 0.02	0.41 ± 0.01				16.75 ± 9.14	4.99 ± 0.06
64 Hex.		0.12 ± 0.01	0.29 ± 0.01		6.69 ± 0.05		6.72 ± 4.51	
65 H ₂ O/EtOH	9.59 ± 0.04	1.05 ± 0.04	0.36 ± 0.01				4.38 ± 1.51	
65 EtOH	7.88 ± 0.07	0.99 ± 0.03	0.57 ± 0.01			31.08 ± 0.65	5.11 ± 2.88	1.74 ± 0.01
65 AcEt.	1.95 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.42 ± 0.02			2.33 ± 0.11	17.18 ± 13.34	1.47 ± 0.01
65 Hex.	2.37 ± 0.05	0.46 ± 0.01	0.46 ± 0.01				9.73 ± 1.06	
66 H ₂ O/EtOH	44.51 ± 0.05	5.64 ± 0.19	1.73 ± 0.05		6.52 ± 0.08	3.68 ± 0.09		2.58 ± 0.06
66 EtOH	16.11 ± 0.06	3.55 ± 0.05	0.74 ± 0.08			21.95 ± 0.74	26.72 ± 11.04	5.05 ± 0.04
66 AcEt.	2.06 ± 0.04	0.43 ± 0.11	0.58 ± 0.01			4.66 ± 0.02		17.39 ± 0.11
66 Hex.		0.41 ± 0.03	0.46 ± 0.03			6.11 ± 0.02		
67 H ₂ O/EtOH	17.52 ± 0.02	1.48 ± 0.05	0.62 ± 0.01			11.57 ± 0.04		6.53 ± 0.03
67 EtOH	8.94 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01		26.26 ± 0.04		7.77 ± 0.07
67 AcEt.	4.71 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.52 ± 0.01			34.77 ± 0.09		21.67 ± 0.14
67 Hex.	3.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.42 ± 0.01			2.23 ± 0.01		
68 H ₂ O/EtOH	14.56 ± 0.03	0.85 ± 0.09	0.42 ± 0.01		11.67 ± 0.01			
68 EtOH	13.19 ± 0.05	0.81 ± 0.01	0.67 ± 0.02			18.67 ± 0.11		
68 AcEt.	3.98 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.56 ± 0.03			41.71 ± 0.27		32.54 ± 0.23
68 Hex.	6.79 ± 0.03	0.45 ± 0.01	0.49 ± 0.02			3.53 ± 0.01		
69 H ₂ O/EtOH	37.77 ± 0.17	3.26 ± 0.09	0.74 ± 0.02		12.92 ± 0.03	12.45 ± 0.01		
69 EtOH	67.05 ± 0.11	4.83 ± 0.22	0.92 ± 0.06		16.98 ± 0.06	36.83 ± 0.04		6.05 ± 0.03
69 AcEt.	13.68 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.54 ± 0.01			37.19 ± 0.04		43.93 ± 0.11
69 Hex.	8.64 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.42 ± 0.01					
70 H ₂ O/EtOH	94.97 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.81 ± 0.02			70.64 ± 0.02		36.86 ± 0.07
70 EtOH	40.18 ± 0.05	1.69 ± 0.04	1.01 ± 0.13			31.82 ± 0.06		4.53 ± 0.02
70 AcEt.	34.25 ± 0.05	1.18 ± 0.03	0.81 ± 0.05			27.53 ± 0.04		8.72 ± 0.06
70 Hex.	21.68 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.57 ± 0.02			8.71 ± 0.02		
71 H ₂ O/EtOH	56.93 ± 0.09	4.54 ± 0.11	0.86 ± 0.04		9.41 ± 0.07	35.37 ± 0.03		35.31 ± 0.04
71 EtOH	29.42 ± 0.18	3.35 ± 0.21	1.05 ± 0.05		9.17 ± 0.02	86.18 ± 0.01		69.64 ± 0.09
71 AcEt.	25.39 ± 0.05	1.81 ± 0.06	0.71 ± 0.02		5.71 ± 0.18	86.71 ± 0.02		88.24 ± 0.08
71 Hex.	10.21 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.61 ± 0.01			12.83 ± 0.02		7.41 ± 0.13

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
72 H ₂ O/EtOH	15.54 ± 0.01	1.99 ± 0.04	0.36 ± 0.02		1.18 ± 0.11			
72 EtOH	15.98 ± 0.07	2.64 ± 0.06	0.51 ± 0.03			6.07 ± 0.04		0.38 ± 0.08
72 AcEt.	15.61 ± 0.04	1.64 ± 0.04	0.43 ± 0.04			8.85 ± 0.01		51.61 ± 0.03
72 Hex.	4.87 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.01			2.37 ± 0.01		0.41 ± 0.06
73 H ₂ O/EtOH	34.47 ± 0.14	4.49 ± 0.06	1.91 ± 0.06			16.48 ± 0.05		4.38 ± 0.02
73 EtOH	16.98 ± 0.03	2.34 ± 0.08	1.33 ± 0.03	0.59 ± 0.01		50.17 ± 0.28		12.16 ± 0.06
73 AcEt.	13.86 ± 0.06	0.63 ± 0.04	0.72 ± 0.05			94.65 ± 0.02		69.62 ± 0.38
73 Hex.	11.79 ± 0.07	0.52 ± 0.01	0.69 ± 0.02			69.56 ± 0.02		
74 H ₂ O/EtOH	17.41 ± 0.02	1.93 ± 0.06	0.61 ± 0.01		6.74 ± 0.03	6.64 ± 0.03		
74 EtOH	13.49 ± 0.08	1.85 ± 0.03	0.50 ± 0.05			89.24 ± 0.02		29.22 ± 0.05
74 AcEt.	9.52 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.51 ± 0.01			64.78 ± 0.04		
74 Hex.	6.06 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.50 ± 0.01			15.93 ± 0.03		
75 H ₂ O/EtOH	35.36 ± 0.17	2.86 ± 0.09	0.41 ± 0.01			8.96 ± 0.02		
75 EtOH	24.37 ± 0.04	1.39 ± 0.66	0.57 ± 0.02			3.93 ± 0.03		
75 AcEt.	6.14 ± 0.04	0.72 ± 0.03	0.57 ± 0.06			3.67 ± 0.03		
75 Hex.	3.52 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.51 ± 0.01			11.39 ± 0.05		45.35 ± 0.07
76 H ₂ O/EtOH	91.58 ± 0.05	8.20 ± 0.09	1.02 ± 0.04			31.72 ± 0.03		
76 EtOH	66.22 ± 0.04	3.93 ± 0.17	1.08 ± 0.09			74.04 ± 0.12		
76 AcEt.	7.87 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.59 ± 0.05			51.66 ± 0.09		4.43 ± 0.01
76 Hex.	3.94 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.64 ± 0.01			17.04 ± 0.04		7.49 ± 0.04
77 H ₂ O/EtOH	64.39 ± 0.02	4.21 ± 0.43	0.62 ± 0.03		1.11 ± 0.06	22.34 ± 0.02		32.30 ± 0.02
77 EtOH	26.21 ± 0.07	1.39 ± 0.05	0.83 ± 0.01			20.78 ± 0.20		
77 AcEt.	5.81 ± 0.06	0.34 ± 0.02	0.64 ± 0.02			18.03 ± 0.02		
77 Hex.	0.95 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.51 ± 0.01			9.38 ± 0.02		
78 H ₂ O/EtOH	9.74 ± 0.05	0.96 ± 0.03	0.47 ± 0.01		9.66 ± 0.06	1.31 ± 0.02		
78 EtOH	8.35 ± 0.04	1.41 ± 0.02	0.88 ± 0.01		56.89 ± 0.01	68.55 ± 0.07		
78 AcEt.	7.86 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.63 ± 0.05			67.36 ± 0.04		
78 Hex.	3.04 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.61 ± 0.01			54.67 ± 0.07		
79 H ₂ O/EtOH	31.68 ± 0.12	2.07 ± 0.04	0.71 ± 0.02		1.29 ± 0.04	5.11 ± 0.01		
79 EtOH	19.27 ± 0.02	1.35 ± 0.26	0.61 ± 0.01					
79 AcEt.	2.44 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.37 ± 0.01		18.59 ± 0.07			3.61 ± 0.06
79 Hex.	1.69 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.39 ± 0.01			0.86 ± 0.02		
80 H ₂ O/EtOH	94.17 ± 0.03	7.92 ± 0.20	0.82 ± 0.02			56.31 ± 0.04		74.13 ± 0.02
80 EtOH	60.12 ± 0.04	2.17 ± 0.19	0.87 ± 0.03			39.97 ± 0.03		
80 AcEt.	17.95 ± 0.04	1.39 ± 0.05	0.94 ± 0.08			58.77 ± 0.07		61.81 ± 0.05
80 Hex.	9.55 ± 0.04	0.72 ± 0.03	0.64 ± 0.05			19.51 ± 0.04		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
81 H ₂ O/EtOH	23.05 ± 0.03	1.53 ± 0.05	0.54 ± 0.03			8.64 ± 0.02		12.46 ± 0.06
81 EtOH	22.21 ± 0.03	1.85 ± 0.03	1.33 ± 0.01			20.79 ± 0.02		53.79 ± 0.03
81 AcEt.	0.68 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.78 ± 0.03			18.72 ± 0.02		
81 Hex.	1.41 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.54 ± 0.01			5.43 ± 0.05		22.47 ± 0.04
82 H ₂ O/EtOH	2.34 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.54 ± 0.09			1.84 ± 0.02		15.98 ± 0.01
82 EtOH	14.23 ± 0.03	1.25 ± 0.03	0.54 ± 0.01		8.41 ± 0.04	78.02 ± 0.02		30.92 ± 0.18
82 AcEt.	3.31 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.64 ± 0.01			61.81 ± 0.04		33.58 ± 0.08
82 Hex.	0.47 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.42 ± 0.01					17.97 ± 0.03
83 H ₂ O/EtOH	25.81 ± 0.05	1.44 ± 0.03	0.45 ± 0.01		8.08 ± 0.09	1.54 ± 0.01		
83 EtOH	21.23 ± 0.06	1.41 ± 0.06	0.72 ± 0.02			98.63 ± 0.01		38.95 ± 0.15
83 AcEt.		0.29 ± 0.01	0.65 ± 0.06			28.78 ± 0.03		35.43 ± 0.13
83 Hex.	4.28 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.01					
84 H ₂ O/EtOH	6.84 ± 0.04	0.78 ± 0.03	0.46 ± 0.01					
84 EtOH	8.75 ± 0.05	1.55 ± 0.10	0.99 ± 0.05					
84 AcEt.	0.52 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.64 ± 0.02					32.19 ± 0.23
84 Hex.			0.37 ± 0.01		9.76 ± 0.04			11.12 ± 0.03
85 H ₂ O/EtOH	6.28 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.36 ± 0.01		3.84 ± 0.01			16.14 ± 0.02
85 EtOH	31.41 ± 0.04	2.19 ± 0.03	0.67 ± 0.13			63.12 ± 0.01		99.15 ± 0.26
85 AcEt.	4.98 ± 0.07	0.59 ± 0.01	0.65 ± 0.06			4.91 ± 0.05		79.79 ± 0.51
85 Hex.		0.27 ± 0.01	0.65 ± 0.02			14.33 ± 0.01		24.52 ± 0.04
86 H ₂ O/EtOH	1.01 ± 0.02	1.99 ± 0.04	0.56 ± 0.02			26.45 ± 0.01		5.61 ± 0.03
86 EtOH	0.91 ± 0.04	1.74 ± 0.04	0.66 ± 0.04			26.86 ± 0.03		4.22 ± 0.09
86 AcEt.		0.94 ± 0.04	0.52 ± 0.03			11.64 ± 0.03		6.48 ± 0.08
86 Hex.	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.66 ± 0.02			9.43 ± 0.07		6.74 ± 0.01
87 H ₂ O/EtOH	10.99 ± 0.06	0.86 ± 0.02	0.45 ± 0.01		21.23 ± 0.07	2.77 ± 0.01		5.35 ± 0.06
87 EtOH	9.19 ± 0.07	0.63 ± 0.01	0.51 ± 0.01			6.42 ± 0.02		
87 AcEt.		0.21 ± 0.01	0.52 ± 0.01					21.48 ± 0.02
87 Hex.	3.35 ± 0.05	2.07 ± 0.02	0.43 ± 0.01		10.72 ± 0.88			
88 H ₂ O/EtOH	25.59 ± 0.05	1.24 ± 0.03	0.98 ± 0.03	5.99 ± 0.01	1.35 ± 0.02	8.58 ± 0.01		11.21 ± 0.02
88 EtOH	14.29 ± 0.03		0.89 ± 0.03	5.12 ± 0.01	2.36 ± 0.03	18.99 ± 0.03		
88 AcEt.	9.36 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.92 ± 0.02		1.59 ± 0.02	22.12 ± 0.06		
88 Hex.		0.11 ± 0.01	0.45 ± 0.01					
89 H ₂ O/EtOH	3.11 ± 0.05	0.52 ± 0.02	0.45 ± 0.01			6.55 ± 0.03		
89 EtOH	1.01 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.58 ± 0.11					
89 AcEt.		0.25 ± 0.02	0.52 ± 0.05	3.91 ± 0.01				
89 Hex.	1.01 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.44 ± 0.01		0.25 ± 0.04			

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
90 H ₂ O/EtOH	6.91 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.55 ± 0.01		2.16 ± 0.03	8.71 ± 0.05		
90 EtOH	3.61 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.52 ± 0.05		1.36 ± 0.02	0.37 ± 0.01		
90 AcEt.		0.32 ± 0.02	0.54 ± 0.03		1.72 ± 0.02	2.45 ± 0.08		
90 Hex.		0.08 ± 0.01	0.46 ± 0.01					
91 H ₂ O/EtOH	22.07 ± 0.03	1.09 ± 0.03	0.48 ± 0.06		1.49 ± 0.03	6.79 ± 0.07		
91 EtOH	4.01 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.51 ± 0.02		1.89 ± 0.03			
91 AcEt.	2.95 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.64 ± 0.08		1.12 ± 0.02			
91 Hex.		0.09 ± 0.01	0.47 ± 0.01		1.59 ± 0.01			
92 H ₂ O/EtOH	7.48 ± 0.05	0.85 ± 0.38	0.42 ± 0.02		1.81 ± 0.03	1.72 ± 0.04		
92 EtOH	0.31 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.45 ± 0.06		1.58 ± 0.03			
92 AcEt.	0.85 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.66 ± 0.02		2.81 ± 0.02	2.06 ± 0.05		
92 Hex.	1.24 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.44 ± 0.02					
93 H ₂ O/EtOH	5.43 ± 0.05	0.83 ± 0.01	0.39 ± 0.01		0.86 ± 0.02	7.57 ± 0.03		
93 EtOH	2.67 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.49 ± 0.02	2.22 ± 0.03	3.25 ± 0.02	16.89 ± 0.02		
93 AcEt.	1.91 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.63 ± 0.04		4.36 ± 0.02	2.71 ± 0.05		
93 Hex.	0.55 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.45 ± 0.01					
94 H ₂ O/EtOH	61.25 ± 0.06	3.39 ± 0.15	0.71 ± 0.04	6.62 ± 0.02				
94 EtOH	10.17 ± 0.04	0.77 ± 0.03	0.52 ± 0.02	9.23 ± 0.01		0.16 ± 0.08		
94 AcEt.	3.39 ± 0.02	0.71 ± 0.16	0.63 ± 0.05	5.09 ± 0.08	0.42 ± 0.04	14.38 ± 0.03		
94 Hex.	0.25 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.43 ± 0.01			2.13 ± 0.02		
95 H ₂ O/EtOH	33.26 ± 0.08	3.52 ± 0.12	0.53 ± 0.02	10.31 ± 0.01	1.83 ± 0.03	67.43 ± 0.08		
95 EtOH	9.72 ± 0.04	1.91 ± 0.07	0.61 ± 0.02			40.24 ± 0.02		
95 AcEt.	4.44 ± 0.03	1.53 ± 0.06	0.62 ± 0.02			11.41 ± 0.01		
95 Hex.	0.46 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.42 ± 0.02		0.75 ± 0.02	0.76 ± 0.03		
96 H ₂ O/EtOH		0.02 ± 0.01	0.41 ± 0.08	9.79 ± 0.05				
96 EtOH		0.12 ± 0.01	0.40 ± 0.01					
96 AcEt.		0.19 ± 0.01	0.50 ± 0.01					
96 Hex.		0.09 ± 0.01	0.44 ± 0.01		7.23 ± 0.03			
97 H ₂ O/EtOH	0.97 ± 0.06	3.33 ± 0.10	0.43 ± 0.02	10.38 ± 0.05		6.97 ± 0.13		46.05 ± 0.02
97 EtOH	9.14 ± 0.03	1.64 ± 0.04	0.54 ± 0.01	4.97 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.03		79.36 ± 0.04
97 AcEt.	4.07 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.81 ± 0.04		0.95 ± 0.03	0.94 ± 0.03		80.15 ± 0.03
97 Hex.		0.05 ± 0.01	0.38 ± 0.01		1.06 ± 0.04	1.06 ± 0.04		
98 H ₂ O/EtOH	6.04 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.38 ± 0.01		3.56 ± 0.03	33.47 ± 0.01		
98 EtOH	14.02 ± 0.06	2.23 ± 0.04	1.89 ± 0.10			15.34 ± 0.05		
98 AcEt.	5.46 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.89 ± 0.01			8.22 ± 0.02		
98 Hex.		0.13 ± 0.01	0.38 ± 0.01		4.16 ± 0.06	4.15 ± 0.05		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
99 H ₂ O/EtOH		0.74 ± 0.01	0.45 ± 0.01	2.59 ± 0.02	3.26 ± 0.03	4.29 ± 0.01		
99 EtOH		0.62 ± 0.01	0.57 ± 0.08					
99 AcEt.		0.57 ± 0.02	0.64 ± 0.01		9.46 ± 0.03	9.46 ± 0.03		
99 Hex.		0.12 ± 0.01	0.52 ± 0.01		2.25 ± 0.03	2.24 ± 0.03		
100 H ₂ O/EtOH	58.81 ± 0.31	6.28 ± 0.23	2.43 ± 0.25		0.66 ± 0.09	58.89 ± 0.08		
100 EtOH	88.02 ± 0.02	7.56 ± 0.09	3.82 ± 0.32		0.82 ± 0.03	85.16 ± 0.01		
100 AcEt.	17.51 ± 0.03	2.01 ± 0.16	0.97 ± 0.06		0.82 ± 0.03	0.81 ± 0.03		
100 Hex.		0.25 ± 0.01	0.54 ± 0.02					
101 H ₂ O/EtOH	28.42 ± 0.03	1.99 ± 0.02	0.69 ± 0.05			15.56 ± 0.06		
101 EtOH	17.09 ± 0.04	0.86 ± 0.11	1.05 ± 0.01					
101 AcEt.	1.98 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.80 ± 0.03		3.07 ± 0.01	0.69 ± 0.03		
101 Hex.	0.95 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.77 ± 0.01			6.26 ± 0.06		
102 H ₂ O/EtOH	29.67 ± 0.28	8.09 ± 0.26	1.08 ± 0.02			10.31 ± 0.02		43.19 ± 0.06
102 EtOH	41.34 ± 0.21	6.74 ± 0.02	0.91 ± 0.03					58.18 ± 0.09
102 AcEt.	11.82 ± 0.04	0.86 ± 0.12	0.79 ± 0.01					49.65 ± 0.08
102 Hex.	1.03 ± 0.02		0.57 ± 0.01			29.24 ± 1.07		
103 H ₂ O/EtOH	24.51 ± 0.19	5.16 ± 0.25	0.81 ± 0.03			50.89 ± 0.12		
103 EtOH	35.41 ± 0.07	2.88 ± 0.13	1.14 ± 0.03			45.10 ± 0.13		
103 AcEt.	12.73 ± 0.04	1.06 ± 0.08	1.03 ± 0.06			33.68 ± 0.06		
103 Hex.	7.18 ± 0.06		1.18 ± 0.03			71.97 ± 0.31		
104 H ₂ O/EtOH	64.16 ± 0.01		0.69 ± 0.05			23.27 ± 0.02		26.39 ± 0.04
104 EtOH	36.76 ± 0.06	5.71 ± 0.19	0.95 ± 0.03			21.17 ± 0.21		5.21 ± 0.01
104 AcEt.	2.89 ± 0.04	2.05 ± 0.08	0.96 ± 0.09			9.73 ± 0.02		51.11 ± 0.02
104 Hex.	1.33 ± 0.02		0.76 ± 0.03			28.43 ± 0.86		
105 H ₂ O/EtOH	30.56 ± 0.02	3.69 ± 0.07	0.65 ± 0.01			0.91 ± 0.02		
105 EtOH	9.11 ± 0.03	1.52 ± 0.07	0.56 ± 0.01			34.99 ± 0.22		51.51 ± 0.01
105 AcEt.	8.42 ± 0.03	0.22 ± 0.06	0.92 ± 0.01			27.33 ± 0.07		
105 Hex.	3.59 ± 0.02		0.96 ± 0.23			31.61 ± 0.47		
106 H ₂ O/EtOH	15.95 ± 0.03	2.15 ± 0.13	0.99 ± 0.11			4.89 ± 0.05		38.44 ± 0.01
106 EtOH	11.25 ± 0.03	0.66 ± 0.06	0.71 ± 0.02			24.43 ± 0.06		71.19 ± 0.02
106 AcEt.	4.61 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.84 ± 0.04			10.79 ± 0.15		74.81 ± 0.01
106 Hex.			0.66 ± 0.02	0.78 ± 0.09		26.04 ± 0.96		
107 H ₂ O/EtOH	24.95 ± 0.02	1.12 ± 0.03	0.61 ± 0.14			5.05 ± 0.01		
107 EtOH	87.67 ± 0.02	5.06 ± 0.08	0.52 ± 0.01			54.87 ± 0.11		
107 AcEt.	13.97 ± 0.04	0.51 ± 0.05	0.63 ± 0.01			2.82 ± 0.06		
107 Hex.	4.75 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.31 ± 0.01		0.31 ± 0.11	14.06 ± 0.71		

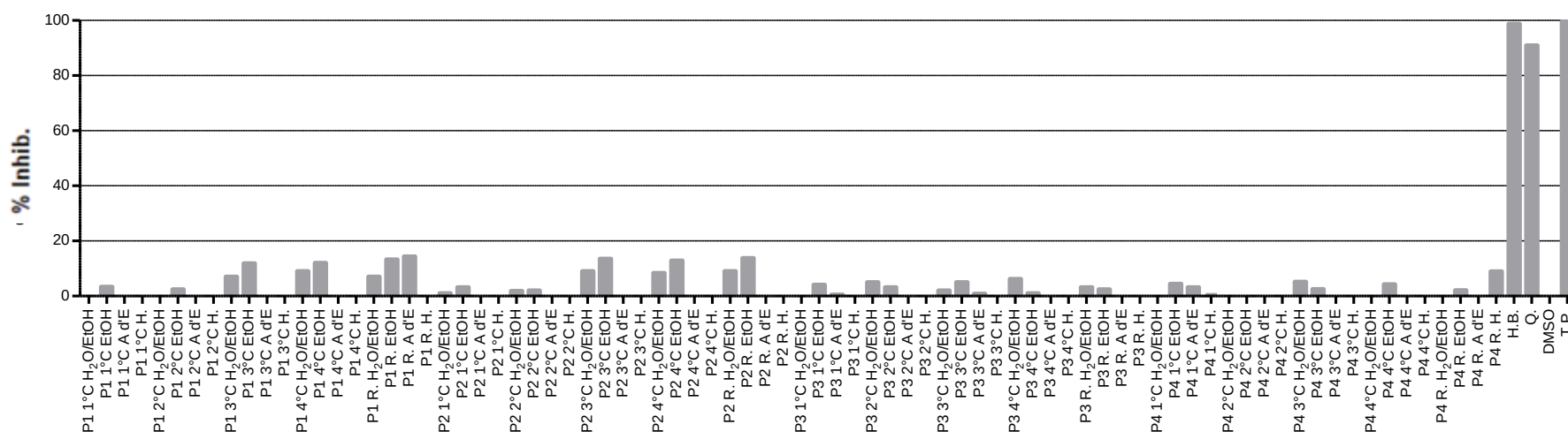
M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
108 H ₂ O/EtOH	0.14 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.04					
108 EtOH	0.97 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.64 ± 0.02			3.54 ± 0.06		
108 AcEt.	0.58 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.53 ± 0.03			5.08 ± 0.06		
108 Hex.	0.87 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.06			1.48 ± 0.76		
109 H ₂ O/EtOH	52.85 ± 0.28	1.76 ± 0.02	1.21 ± 0.15			2.99 ± 0.07		
109 EtOH	58.07 ± 0.31	1.97 ± 0.03	1.06 ± 0.03			23.23 ± 0.07		
109 AcEt.	28.46 ± 0.06	1.09 ± 1.12	1.13 ± 0.11			35.69 ± 0.24		43.08 ± 0.01
109 Hex.	5.32 ± 0.04	0.47 ± 0.02	3.43 ± 0.23			28.21 ± 0.79		
110 H ₂ O/EtOH	83.22 ± 0.04	3.33 ± 0.12	3.07 ± 0.21		0.43 ± 0.01	44.43 ± 0.46		49.14 ± 0.41
110 EtOH	65.58 ± 0.04	1.91 ± 0.18	2.71 ± 0.11			58.82 ± 0.12		49.61 ± 0.75
110 AcEt.	11.57 ± 0.03	0.53 ± 0.03	1.37 ± 0.04			58.83 ± 0.11		63.87 ± 1.15
110 Hex.	6.81 ± 0.02	0.19 ± 0.01	2.17 ± 0.06			51.81 ± 0.07		98.62 ± 0.01
111 H ₂ O/EtOH	15.33 ± 0.05	0.65 ± 0.01	1.33 ± 0.12		2.82 ± 0.02	4.93 ± 0.31		
111 EtOH	4.84 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.03 ± 0.15		2.56 ± 0.03	36.94 ± 0.23		
111 AcEt.	4.37 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.79 ± 0.01		0.85 ± 0.03	58.47 ± 0.18		25.47 ± 0.04
111 Hex.	2.34 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.85 ± 0.05			60.99 ± 0.29		54.79 ± 0.13
112 H ₂ O/EtOH	41.79 ± 0.06	1.79 ± 0.05	0.87 ± 0.03		0.24 ± 0.02	126.62 ± 0.29		0.68 ± 0.01
112 EtOH	32.64 ± 0.07	1.66 ± 0.01	1.79 ± 0.02		3.19 ± 0.03	100.14 ± 0.03		6.07 ± 0.03
112 AcEt.	1.84 ± 0.03	0.61 ± 0.03	1.79 ± 0.03		2.63 ± 0.02	2.97 ± 0.34		86.13 ± 0.06
112 Hex.	4.73 ± 0.03	0.12 ± 0.01	2.43 ± 0.16			2.97 ± 0.35		0.02 ± 0.03
113 H ₂ O/EtOH	29.97 ± 0.06	1.08 ± 0.03	1.52 ± 0.13		0.55 ± 0.02	6.01 ± 0.21		
113 EtOH	12.15 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.62 ± 0.01		4.08 ± 0.02			
113 AcEt.	7.36 ± 0.03	0.35 ± 0.11	0.95 ± 0.11		3.89 ± 0.02	17.81 ± 0.09		
113 Hex.	0.87 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.81 ± 0.03			52.83 ± 0.34		
114 H ₂ O/EtOH	15.76 ± 0.05	1.03 ± 0.16	1.01 ± 0.03		4.85 ± 0.02	33.53 ± 0.06		
114 EtOH	11.51 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.52 ± 0.01		5.62 ± 0.02			0.55 ± 0.03
114 AcEt.	4.45 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.82 ± 0.07		1.25 ± 0.03	34.12 ± 0.13		
114 Hex.	6.41 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.82 ± 0.04		0.14 ± 0.02	40.88 ± 0.12		
115 H ₂ O/EtOH	59.41 ± 0.36	2.96 ± 0.08	0.56 ± 0.01		3.49 ± 0.02	46.47 ± 0.22		39.42 ± 0.11
115 EtOH	14.56 ± 0.03	1.58 ± 0.04	1.58 ± 0.05		4.71 ± 0.03	6.04 ± 0.21		59.03 ± 0.73
115 AcEt.	12.64 ± 0.04	0.61 ± 0.03	2.27 ± 0.08		2.21 ± 0.01	18.75 ± 0.01		95.81 ± 0.02
115 Hex.	6.31 ± 0.02	0.16 ± 0.01	1.96 ± 0.11			23.77 ± 0.08		20.81 ± 0.11
116 H ₂ O/EtOH	75.45 ± 0.09	2.63 ± 0.09	1.86 ± 0.08		3.27 ± 0.04	32.21 ± 0.12		6.39 ± 0.04
116 EtOH	34.51 ± 0.14	1.62 ± 0.05	1.05 ± 0.02		4.03 ± 0.01	15.91 ± 0.05		54.12 ± 0.52
116 AcEt.	12.42 ± 0.04	0.49 ± 0.02	1.34 ± 0.04		0.61 ± 0.01	40.64 ± 0.05		68.95 ± 0.67
116 Hex.	2.36 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.97 ± 0.06			40.63 ± 0.28		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
117 H ₂ O/EtOH		1.37 ± 0.05	0.51 ± 0.01			22.52 ± 0.15		3.08 ± 0.01
117 EtOH	5.12 ± 0.05	0.31 ± 0.02	1.28 ± 0.05		0.27 ± 0.02	58.61 ± 0.95		
117 AcEt.	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.61 ± 0.01			14.11 ± 0.09		
117 Hex.	6.94 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.68 ± 0.01					
118 H ₂ O/EtOH	75.47 ± 0.04	3.23 ± 0.06	0.47 ± 0.01					
118 EtOH	71.59 ± 0.09	3.27 ± 0.09	4.16 ± 0.11		9.44 ± 0.02	94.56 ± 0.55		7.08 ± 0.07
118 AcEt.	10.49 ± 0.06	0.68 ± 0.03	5.57 ± 0.13			77.35 ± 0.32		41.96 ± 0.28
118 Hex.	1.11 ± 0.06	0.09 ± 0.01	1.63 ± 0.05					14.11 ± 0.06
119 H ₂ O/EtOH	10.91 ± 0.05	0.77 ± 0.03	0.58 ± 0.01					
119 EtOH	4.42 ± 0.03	0.41 ± 0.01	0.61 ± 0.01		2.85 ± 0.03	74.21 ± 1.06		
119 AcEt.		0.25 ± 0.01	1.01 ± 0.01		4.18 ± 0.02	43.72 ± 0.04		53.32 ± 0.08
119 Hex.	4.01 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.92 ± 0.03			2.72 ± 0.13		
120 H ₂ O/EtOH	64.94 ± 0.41	3.69 ± 0.08	0.61 ± 0.01	12.92 ± 0.03	21.46 ± 0.06	48.01 ± 0.61		69.06 ± 0.04
120 EtOH	11.41 ± 0.04	0.86 ± 0.03	0.82 ± 0.01		6.01 ± 0.03	63.28 ± 0.96		
120 AcEt.	4.48 ± 0.02	0.44 ± 0.03	1.01 ± 0.02		5.09 ± 0.02	54.54 ± 0.24		12.97 ± 0.08
120 Hex.	3.61 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.97 ± 0.15		0.82 ± 0.02	41.97 ± 0.21		65.99 ± 0.07
121 H ₂ O/EtOH	65.48 ± 0.42	3.81 ± 1.92	0.54 ± 0.01	27.64 ± 0.04	30.14 ± 0.04	31.18 ± 0.97		72.15 ± 0.03
121 EtOH	14.79 ± 0.05	1.03 ± 0.07	1.31 ± 0.06		12.76 ± 0.04	63.29 ± 0.79		21.53 ± 0.03
121 AcEt.	9.07 ± 0.06	0.77 ± 0.08	1.44 ± 0.03		11.56 ± 0.01	60.11 ± 0.02		89.38 ± 0.07
121 Hex.	0.58 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.63 ± 0.05		0.71 ± 0.01	77.31 ± 0.41		62.78 ± 0.19
122 H ₂ O/EtOH	72.28 ± 0.09	1.91 ± 0.03	0.67 ± 0.01	6.64 ± 0.16		56.97 ± 0.46		67.15 ± 0.02
122 EtOH	91.21 ± 0.06	1.92 ± 0.06	1.18 ± 0.07		17.06 ± 0.03	119.47 ± 0.53		64.52 ± 0.01
122 AcEt.	97.14 ± 0.02	2.73 ± 0.14	1.52 ± 0.21	10.63 ± 0.11	36.32 ± 0.09	87.99 ± 0.52		74.48 ± 0.03
122 Hex.	75.42 ± 0.06	1.28 ± 0.04	1.08 ± 0.02		14.27 ± 0.01	120.72 ± 0.81		69.41 ± 0.03
123 H ₂ O/EtOH	57.46 ± 0.35	3.14 ± 0.03	1.46 ± 0.03	4.68 ± 0.02	10.27 ± 0.06	49.91 ± 0.14		69.28 ± 0.01
123 EtOH	10.48 ± 0.02	3.14 ± 0.08	0.92 ± 0.01		7.78 ± 0.01	71.21 ± 0.93		80.76 ± 0.04
123 AcEt.		0.32 ± 0.01	0.68 ± 0.03			38.21 ± 0.11		75.56 ± 0.05
123 Hex.		0.05 ± 0.01	0.53 ± 0.01			19.43 ± 0.16		
124 H ₂ O/EtOH	23.82 ± 0.12	1.27 ± 0.13	1.19 ± 0.04					0.76 ± 0.08
124 EtOH	6.46 ± 0.05	0.55 ± 0.01	1.02 ± 0.06	2.44 ± 0.04	7.18 ± 0.03	72.22 ± 0.91		86.04 ± 0.06
124 AcEt.		0.19 ± 0.01	1.04 ± 0.02		0.99 ± 0.02	67.51 ± 0.74		40.66 ± 0.54
124 Hex.		0.11 ± 0.01	0.61 ± 0.01		5.33 ± 0.01	4.54 ± 0.04		
125 H ₂ O/EtOH	9.06 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.48 ± 0.01		1.63 ± 0.01	8.91 ± 0.12		0.11 ± 0.01
125 EtOH	2.91 ± 0.01	0.31 ± 0.01	1.04 ± 0.01		2.71 ± 0.01	59.98 ± 0.51		5.07 ± 0.07
125 AcEt.	2.38 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.41 ± 0.06			45.38 ± 0.78		3.34 ± 0.02
125 Hex.	3.92 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.01	4.67 ± 0.04	6.41 ± 0.02			

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
126 H ₂ O/EtOH	48.37 ± 0.12	2.37 ± 0.06	0.98 ± 0.01	8.27 ± 0.06	1.36 ± 0.02	46.51 ± 0.12		32.94 ± 0.11
126 EtOH	56.46 ± 0.16	2.97 ± 0.08	1.17 ± 0.18	3.73 ± 0.03	3.41 ± 0.05	125.82 ± 0.58		33.20 ± 0.05
126 AcEt.	8.11 ± 0.05	0.82 ± 0.01	1.62 ± 0.04		3.24 ± 0.03	73.47 ± 0.67		24.89 ± 0.33
126 Hex.	4.27 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.45 ± 0.01		2.71 ± 0.03			
127 H ₂ O/EtOH	11.76 ± 0.11	0.85 ± 0.03	0.63 ± 0.01			18.55 ± 0.17		
127 EtOH	0.48 ± 0.04		0.74 ± 0.08		1.98 ± 0.02	48.68 ± 0.47		24.82 ± 1.04
127 AcEt.	2.34 ± 0.04		0.81 ± 0.05		1.62 ± 0.01	25.17 ± 0.34		18.28 ± 0.27
127 Hex.	4.04 ± 0.06		0.44 ± 0.01	4.43 ± 0.05	2.87 ± 0.01			
128 H ₂ O/EtOH	92.61 ± 0.04		4.21 ± 0.15	3.18 ± 0.03	14.22 ± 0.02	105.74 ± 0.08		52.93 ± 0.05
128 EtOH	43.36 ± 0.08		4.83 ± 0.11			122.64 ± 0.58		66.92 ± 0.47
128 AcEt.	12.86 ± 0.05		4.29 ± 0.24	0.07 ± 0.01		82.63 ± 0.21		60.56 ± 0.78
128 Hex.	3.45 ± 0.04		1.78 ± 0.07		2.14 ± 0.02	11.72 ± 0.03		48.67 ± 0.13
129 H ₂ O/EtOH	95.96 ± 0.01		0.72 ± 0.03	58.67 ± 0.01	51.22 ± 0.01	100 ± 0.		54.63 ± 0.02
129 EtOH	95.42 ± 0.01		0.75 ± 0.25	15.79 ± 0.05	19.48 ± 0.01	115.57 ± 0.16		65.18 ± 0.04
129 AcEt.	24.04 ± 0.09		0.61 ± 0.03		0.35 ± 0.03	65.06 ± 0.51		20.09 ± 0.15
129 Hex.	4.65 ± 0.15		0.37 ± 0.01		3.79 ± 0.03			0.87 ± 0.02
130 H ₂ O/EtOH	30.36 ± 0.09		0.89 ± 0.02			81.17 ± 0.03		21.35 ± 0.05
130 EtOH	60.92 ± 0.15		1.22 ± 0.08			121.31 ± 0.09		56.44 ± 0.03
130 AcEt.	40.41 ± 0.29		0.94 ± 0.07		0.84 ± 0.04	121.64 ± 0.43		73.12 ± 0.22
130 Hex.	27.36 ± 0.07		1.02 ± 0.03			97.04 ± 0.03		6.86 ± 0.05
131 H ₂ O/EtOH	11.74 ± 0.06		0.53 ± 0.06			25.65 ± 0.09		0.66 ± 0.02
131 EtOH	3.89 ± 0.07		0.82 ± 0.04		12.07 ± 0.03	45.01 ± 0.5		2.48 ± 0.03
131 AcEt.			0.91 ± 0.06		15.98 ± 0.02	33.39 ± 0.56		8.07 ± 0.02
131 Hex.	5.47 ± 0.13		0.91 ± 0.02		12.56 ± 0.03	30.88 ± 0.01		68.27 ± 0.42
132 H ₂ O/EtOH	41.89 ± 0.05	2.98 ± 0.05	0.30 ± 0.01		4.83 ± 0.01	21.85 ± 0.28		0.08 ± 0.01
132 EtOH	31.98 ± 0.06	2.68 ± 0.02	1.08 ± 0.02		5.48 ± 0.04	39.27 ± 0.01		31.23 ± 0.02
132 AcEt.	5.06 ± 0.02	0.50 ± 0.10	0.75 ± 0.22		13.67 ± 0.03	27.74 ± 0.03		11.72 ± 1.52
132 Hex.	8.26 ± 0.09	0.15 ± 0.1	0.39 ± 0.01	4.14 ± 0.03	13.26 ± 0.01	13.61 ± 0.06		
133 H ₂ O/EtOH	3.41 ± 0.02		1.08 ± 0.04	5.62 ± 0.05	6.89 ± 0.03			10.77 ± 0.03
133 EtOH	0.64 ± 0.04		1.23 ± 0.05		5.26 ± 0.04	27.36 ± 0.07		20.54 ± 0.84
133 AcEt.			1.01 ± 0.05		14.13 ± 0.01	44.19 ± 0.02		19.63 ± 0.48
133 Hex.			0.47 ± 0.04		10.77 ± 0.04	17.45 ± 0.05		
134 H ₂ O/EtOH		0.82 ± 0.08	0.93 ± 0.01	6.84 ± 0.03	5.31 ± 0.06			
134 EtOH		0.45 ± 0.04	1.03 ± 0.02		2.49 ± 0.02	9.88 ± 0.06		
134 AcEt.		0.26 ± 0.01	0.97 ± 0.02		1.06 ± 0.02			
134 Hex.			0.34 ± 0.01	8.34 ± 0.03	3.77 ± 0.06	0.23 ± 0.02		

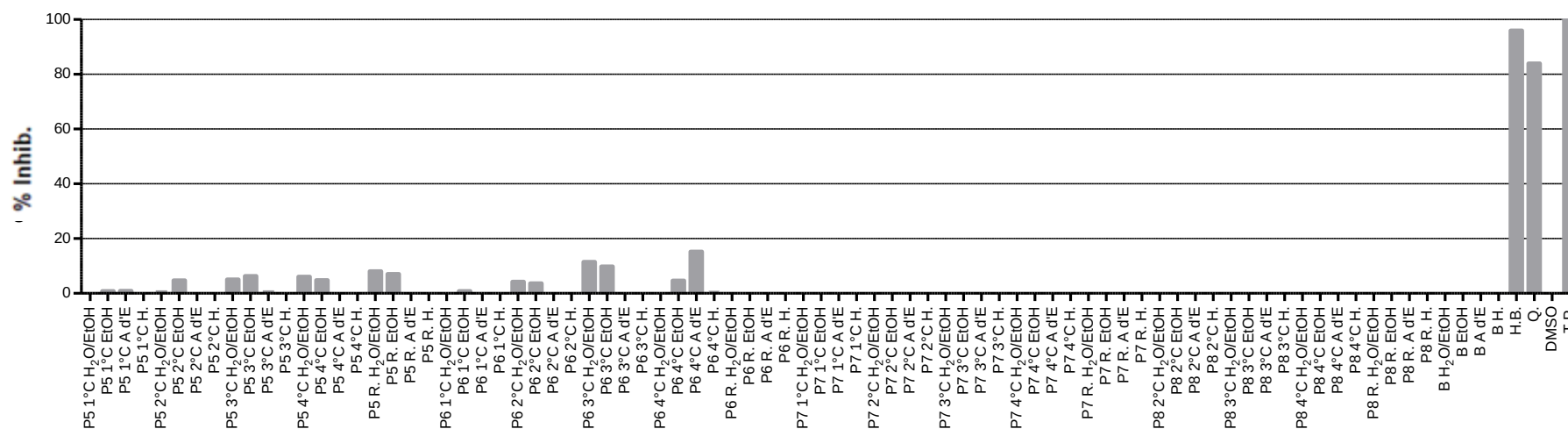
M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Col. % Inhib.	Elast. % Inhib.
135 H ₂ O/EtOH		0.02 ± 0.01	0.29 ± 0.01		12.77 ± 0.07			
135 EtOH		0.27 ± 0.01	0.83 ± 0.03		11.48 ± 0.02			1.08 ± 0.04
135 AcEt.		0.18 ± 0.01	0.76 ± 0.03		11.53 ± 0.03			45.57 ± 2.23
135 Hex.			0.35 ± 0.01	2.38 ± 0.02	12.49 ± 0.05	18.01 ± 0.02		
136 H ₂ O/EtOH	12.42 ± 0.07	0.62 ± 0.02	0.91 ± 0.33	0.33 ± 0.02	8.51 ± 0.12	9.26 ± 0.02		
136 EtOH	42.78 ± 0.08	1.71 ± 0.12	2.64 ± 0.09		9.49 ± 0.01	8.13 ± 0.07		5.25 ± 0.04
136 AcEt.	8.89 ± 0.06	0.48 ± 0.03	0.89 ± 0.06		13.31 ± 0.01	40.64 ± 0.02		55.43 ± 1.11
136 Hex.		0.02 ± 0.01	0.45 ± 0.03		6.72 ± 0.05	84.55 ± 0.01		22.77 ± 0.28
137 H ₂ O/EtOH	29.93 ± 0.07	1.21 ± 0.03	0.32 ± 0.03		6.15 ± 0.06	53.68 ± 0.03		61.31 ± 0.18
137 EtOH	26.05 ± 0.06	1.45 ± 0.03	1.93 ± 0.02			88.99 ± 0.07		57.76 ± 0.14
137 AcEt.	4.73 ± 0.02	0.59 ± 0.04	1.27 ± 0.01		1.81 ± 0.04	100.00 ± 0.02		65.09 ± 1.06
137 Hex.	2.37 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.83 ± 0.22	1.46 ± 0.02		99.48 ± 0.02		47.29 ± 0.34
138 H ₂ O/EtOH	86.14 ± 0.04	3.81 ± 0.09	3.17 ± 0.04	5.61 ± 0.01	6.45 ± 0.04	58.31 ± 0.01		13.77 ± 0.12
138 EtOH	73.45 ± 0.05	2.73 ± 0.11	3.07 ± 0.24	2.68 ± 0.03	14.33 ± 0.04	75.48 ± 0.08		18.54 ± 0.08
138 AcEt.	41.77 ± 0.06	1.22 ± 0.03	1.83 ± 0.09	0.53 ± 0.02	3.01 ± 0.07	38.08 ± 0.09		62.92 ± 0.76
138 Hex.	4.97 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.66 ± 0.01		7.62 ± 0.04			3.05 ± 0.01
139 H ₂ O/EtOH	51.94 ± 0.28	2.64 ± 0.06	2.82 ± 0.07	4.54 ± 0.01	11.92 ± 0.03	41.81 ± 0.02		
139 EtOH	16.71 ± 0.07	0.75 ± 0.02	1.22 ± 0.06	1.49 ± 0.02	3.23 ± 0.07	46.91 ± 0.06		
139 AcEt.	6.21 ± 0.02	0.45 ± 0.01	1.19 ± 0.14		2.54 ± 0.02	37.96 ± 0.05		27.41 ± 0.04
139 Hex.	2.71 ± 0.01		0.86 ± 0.02	0.11 ± 0.04	10.11 ± 0.02	41.72 ± 0.05		
140 H ₂ O/EtOH		0.07 ± 0.01	0.47 ± 0.09	1.12 ± 0.02	7.23 ± 0.02	20.73 ± 0.56		
140 EtOH		0.29 ± 0.02	0.68 ± 0.09	3.01 ± 0.02	9.94 ± 0.04	50.01 ± 0.13		56.61 ± 0.34
140 AcEt.	0.09 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.66 ± 0.05	5.76 ± 0.01	4.48 ± 0.02	54.32 ± 0.07		98.22 ± 0.42
140 Hex.		0.09 ± 0.02	0.57 ± 0.01		9.16 ± 0.01	35.28 ± 0.44		18.76 ± 0.09
141 H ₂ O/EtOH	7.08 ± 0.03	0.44 ± 0.01	0.51 ± 0.01	9.27 ± 0.01	7.17 ± 0.03			
141 EtOH		0.29 ± 0.02	0.71 ± 0.01	1.27 ± 0.03	9.01 ± 0.03	27.13 ± 0.04		
141 AcEt.		0.13 ± 0.01	0.79 ± 0.06		2.19 ± 0.02	24.23 ± 0.09		
141 Hex.	0.51 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.49 ± 0.01	1.83 ± 0.03	6.96 ± 0.03	39.06 ± 0.06		
142 H ₂ O/EtOH	42.08 ± 0.22	3.43 ± 0.08	0.81 ± 0.01	6.81 ± 0.02	13.01 ± 0.05	36.54 ± 0.03		
142 EtOH	10.99 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.63 ± 0.05	3.71 ± 0.01	3.04 ± 0.02	44.23 ± 0.05		
142 AcEt.	14.04 ± 0.02	0.83 ± 1.43	0.84 ± 0.04		6.06 ± 0.02	62.34 ± 0.08		99.89 ± 0.24
142 Hex.	5.19 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.55 ± 0.01	11.05 ± 0.03	5.25 ± 0.04	39.62 ± 0.15		24.01 ± 0.08
143 H ₂ O/EtOH	20.25 ± 0.06	1.07 ± 0.02	0.47 ± 0.03	1.06 ± 0.03	3.41 ± 0.04			
143 EtOH	12.54 ± 0.09	0.84 ± 0.07	0.91 ± 0.02	0.54 ± 0.03	6.03 ± 0.02	21.19 ± 0.02		
143 AcEt.	21.37 ± 0.07	0.68 ± 0.03	1.29 ± 0.05		1.83 ± 0.01	21.75 ± 0.02		9.08 ± 0.09
143 Hex.	4.13 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.59 ± 0.01	4.32 ± 0.01	3.45 ± 0.03	12.13 ± 0.11		29.65 ± 0.09

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	Flav. mg QE/g	L-T. % Inhibition	L-DOPA % Inhibition	Lipox. % Inhibition	Col. % Inhibition	Elast. % Inhibition
144 H ₂ O/EtOH	93.54 ± 0.01	3.25 ± 0.03	0.82 ± 0.04	4.78 ± 0.02	11.06 ± 0.03	71.52 ± 0.01		54.58 ± 0.03
144 EtOH	21.22 ± 0.15	1.83 ± 0.11	0.84 ± 0.01		2.56 ± 0.04	68.92 ± 0.05		
144 AcEt.		0.13 ± 0.01	0.67 ± 0.01			17.16 ± 0.11		3.49 ± 0.11
144 Hex.		0.04 ± 0.01	0.71 ± 0.01		1.59 ± 0.03	30.11 ± 0.28		16.86 ± 0.13
145 H ₂ O/EtOH	17.18 ± 0.02	0.66 ± 0.03	0.55 ± 0.01	0.82 ± 0.02	2.88 ± 0.03			
145 EtOH	14.07 ± 0.08	1.06 ± 0.11	0.64 ± 0.15		1.87 ± 0.02	76.97 ± 0.04		
145 AcEt.		0.17 ± 0.01	2.51 ± 0.04			14.75 ± 0.04		4.34 ± 0.16
145 Hex.		0.03 ± 0.01	0.75 ± 0.01		11.74 ± 0.05	27.01 ± 0.51		24.52 ± 0.16
146 H ₂ O/EtOH	19.61 ± 0.05	1.15 ± 0.02	0.55 ± 0.03		14.35 ± 0.06	29.71 ± 0.05		
146 EtOH	3.75 ± 0.02	0.41 ± 0.11	0.74 ± 0.07		6.52 ± 0.01	49.19 ± 0.02		
146 AcEt.	9.01 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.88 ± 0.08		11.95 ± 0.02	40.25 ± 0.06		
146 Hex.		0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.09		34.52 ± 0.03	50.25 ± 0.65		
147 H ₂ O/EtOH	80.03 ± 0.02	2.33 ± 0.04	0.58 ± 0.01	17.12 ± 0.02	54.59 ± 0.07	50.48 ± 0.03		0.47 ± 0.04
147 EtOH	83.66 ± 0.03	1.68 ± 0.14	0.59 ± 0.03		35.13 ± 0.07	29.15 ± 0.53		
147 AcEt.	28.37 ± 0.07	0.66 ± 0.04	2.23 ± 0.07		11.77 ± 0.05	11.32 ± 0.31		
147 Hex.		0.03 ± 0.01	1.47 ± 0.09	2.07 ± 0.02	1.76 ± 0.02			
148 H ₂ O/EtOH	60.46 ± 0.03	1.21 ± 0.04	0.57 ± 0.01	9.28 ± 0.02				0.43 ± 0.06
148 EtOH	21.31 ± 0.02	1.21 ± 0.15	0.56 ± 0.01		39.99 ± 0.15	49.74 ± 0.24		
148 AcEt.	0.54 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.74 ± 0.01		5.46 ± 0.04	40.21 ± 0.12		
148 Hex.	2.26 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.71 ± 0.02					
149 H ₂ O/EtOH	23.42 ± 0.07	3.04 ± 0.03	0.59 ± 0.01			0.47 ± 0.03		
149 EtOH	19.32 ± 0.03	1.53 ± 0.07	1.24 ± 0.01			30.75 ± 0.92		47.05 ± 0.09
149 AcEt.	0.84 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.81 ± 0.01			21.65 ± 0.58		
149 Hex.		0.05 ± 0.01	0.98 ± 0.02			18.06 ± 0.02		
150 H ₂ O/EtOH	57.34 ± 0.01	4.64 ± 0.13	3.56 ± 0.12		4.79 ± 0.02	37.71 ± 0.04	9.15 ± 5.07	
150 EtOH	44.56 ± 0.03	4.19 ± 0.18	3.48 ± 0.06		3.16 ± 0.02	44.58 ± 0.06	16.86 ± 12.21	30.02 ± 0.15
150 AcEt.	6.22 ± 0.01	1.25 ± 0.04	0.55 ± 0.14			48.08 ± 0.02	5.02 ± 0.91	30.02 ± 0.07
150 Hex.	2.14 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02		6.22 ± 0.03	2.13 ± 0.02	3.82 ± 0.94	



Representación gráfica del porcentaje de inhibición enzimática de muestras *Juncus sp.* con la enzima elastasa.

Représentation graphique du pourcentage d'inhibition enzymatique des échantillons de *Juncus sp.* avec l'enzyme élastase.



Representación gráfica del porcentaje de inhibición enzimática de muestras *Juncus sp.* con la enzima elastasa.

Représentation graphique du pourcentage d'inhibition enzymatique des échantillons de *Juncus sp.* avec l'enzyme élastase.

RESULTADOS DE MUESTRAS DE *JUNCUS SP.* SOMETIDAS AL ENSAYO DE EXPOSICIÓNRÉSULTATS D'ÉCHANTILLONS DE *JUNCUS SP.* SOUMIS À L'ESSAI D'EXPOSITION

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Elast. % Inhib.
P1 1°C H ₂ O/EtOH	17.17 ± 0.04	0.43 ± 0.18				
P1 1°C EtOH	7.57 ± 0.26	0.56 ± 0.01	2.37 ± 0.05			3.35 ± 0.05
P1 1°C AcEt.	6.28 ± 0.09	0.72 ± 0.02	4.32 ± 0.02		40.39 ± 0.06	
P1 1°C Hex.		0.69 ± 0.02				
P1 2°C H ₂ O/EtOH	25.42 ± 0.31	0.74 ± 0.03				
P1 2°C EtOH	4.38 ± 0.01	0.31 ± 0.01		2.45 ± 0.01	21.78 ± 0.09	2.42 ± 0.05
P1 2°C AcEt.	2.47 ± 0.01	0.11 ± 0.01			1.62 ± 0.03	
P1 2°C Hex.	0.47 ± 0.03	0.15 ± 0.02	5.55 ± 0.02			
P1 3°C H ₂ O/EtOH	9.64 ± 0.02	0.24 ± 0.04				
P1 3°C EtOH	13.96 ± 0.25	0.12 ± 0.03				11.88 ± 0.88
P1 3°C AcEt.	0.82 ± 0.01	0.04 ± 0.01				
P1 3°C Hex.	2.31 ± 0.34					
P1 4°C H ₂ O/EtOH	14.56 ± 0.31	0.71 ± 0.13	1.95 ± 0.01			
P1 4°C EtOH	2.55 ± 0.03	0.09 ± 0.01				
P1 4°C AcEt.	3.95 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.36 ± 0.01			
P1 4°C Hex.	4.54 ± 0.04	0.07 ± 0.01				
P1 R. H ₂ O/EtOH	1.05 ± 0.02					
P1 R. EtOH	9.21 ± 0.18			4.44 ± 0.01		3.31 ± 0.02
P1 R. AcEt.	0.23 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.75 ± 0.01			14.34 ± 0.89
P1 R. Hex.						
P2 1°C H ₂ O/EtOH	18.92 ± 0.05	0.46 ± 0.03				
P2 1°C EtOH	15.43 ± 0.24	0.17 ± 0.02	0.84 ± 0.01		18.45 ± 0.03	4.19 ± 0.02
P2 1°C AcEt.	3.63 ± 0.04	0.11 ± 0.01			9.35 ± 0.07	
P2 1°C Hex.	7.13 ± 0.31	0.03 ± 0.03				
P2 2°C H ₂ O/EtOH	18.49 ± 0.21	0.32 ± 0.06				1.85 ± 0.09
P2 2°C EtOH	16.12 ± 0.21	0.43 ± 0.01	0.71 ± 0.01		9.16 ± 0.02	
P2 2°C AcEt.	6.91 ± 0.35	0.08 ± 0.02	3.17 ± 0.01			
P2 2°C Hex.	4.56 ± 0.05	0.16 ± 0.01		0.91 ± 0.01		
P2 3°C H ₂ O/EtOH	17.73 ± 0.24	0.53 ± 0.16				
P2 3°C EtOH	7.65 ± 0.05	0.51 ± 0.02			12.61 ± 0.04	3.54 ± 0.02
P2 3°C AcEt.	1.55 ± 0.04	0.12 ± 0.01				
P2 3°C Hex.	5.23 ± 0.04	0.09 ± 0.02		1.44 ± 0.01		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Elast. % Inhib.
P2 4°C H ₂ O/EtOH	7.36 ± 0.04	0.43 ± 0.05				3.41 ± 0.06
P2 4°C EtOH		0.02 ± 0.01				2.89 ± 0.02
P2 4°C AcEt.	3.43 ± 0.31	0.03 ± 0.01				
P2 4°C Hex.	1.55 ± 0.01	0.21 ± 0.02				
P2 R. H ₂ O/EtOH	11.14 ± 0.25	0.03 ± 0.01				
P2 R. EtOH		0.03 ± 0.01				2.76 ± 0.02
P2 R. AcEt.						
P2 R. Hex.	2.38 ± 0.29	0.02 ± 0.01				
P3 1°C H ₂ O/EtOH	6.92 ± 0.41	0.72 ± 0.01	2.72 ± 0.01			
P3 1°C EtOH		0.15 ± 0.09	1.11 ± 0.01		0.69 ± 0.05	4.16 ± 0.02
P3 1°C AcEt.		0.11 ± 0.02		2.05 ± 0.01	19.93 ± 0.05	13.57 ± 0.09
P3 1°C Hex.		0.08 ± 0.02	0.61 ± 0.01			
P3 2°C H ₂ O/EtOH		0.71 ± 0.21				
P3 2°C EtOH		0.24 ± 0.01			1.69 ± 0.11	3.21 ± 0.06
P3 2°C AcEt.		0.09 ± 0.01	1.43 ± 0.01			
P3 2°C Hex.		0.21 ± 0.03				
P3 3°C H ₂ O/EtOH	1.69 ± 0.31	0.55 ± 0.01				
P3 3°C EtOH					11.08 ± 0.08	
P3 3°C AcEt.						7.91 ± 0.09
P3 3°C Hex.		0.17 ± 0.5				
P3 4°C H ₂ O/EtOH						10.16 ± 0.06
P3 4°C EtOH	19.66 ± 0.42	0.24 ± 0.01				
P3 4°C AcEt.		0.13 ± 0.01	3.81 ± 0.01			
P3 4°C Hex.			5.91 ± 0.01			
P3 R. H ₂ O/EtOH						13.18 ± 0.79
P3 R. EtOH			9.88 ± 0.01	5.17 ± 0.02		2.47 ± 0.02
P3 R. AcEt.	6.95 ± 0.41	0.02 ± 0.01	1.78 ± 0.02		17.30 ± 0.11	
P3 R. Hex.						
P4 1°C H ₂ O/EtOH	1.27 ± 0.02	0.11 ± 0.03		1.44 ± 0.09		
P4 1°C EtOH		0.09 ± 0.01	8.84 ± 0.02			4.47 ± 0.02
P4 1°C AcEt.		0.11 ± 0.01	1.15 ± 0.01			8.25 ± 0.09
P4 1°C Hex.		0.05 ± 0.01		3.17 ± 0.04		0.34 ± 0.05
P4 2°C H ₂ O/EtOH	7.34 ± 0.35	0.96 ± 0.17	1.39 ± 0.04			
P4 2°C EtOH	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.07		2.33 ± 0.03		
P4 2°C AcEt.		0.05 ± 0.01	8.25 ± 0.01			
P4 2°C Hex.	1.58 ± 0.08	0.23 ± 0.01				

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Elast. % Inhib.
P4 3°C H ₂ O/EtOH		0.97 ± 0.11				5.21 ± 0.02
P4 3°C EtOH	0.58 ± 0.03	0.22 ± 0.01				2.57 ± 0.04
P4 3°C AcEt.		0.06 ± 0.01	1.99 ± 0.01	2.91 ± 0.02		
P4 3°C Hex.	0.63 ± 0.06	0.12 ± 0.02	1.09 ± 0.01	0.93 ± 0.03		
P4 4°C H ₂ O/EtOH	6.57 ± 0.39	0.67 ± 0.04				
P4 4°C EtOH	0.31 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.27 ± 0.01	2.43 ± 0.02		4.31 ± 0.01
P4 4°C AcEt.		0.03 ± 0.01	4.14 ± 0.02			
P4 4°C Hex.		0.02 ± 0.01				
P4 R. H ₂ O/EtOH		0.49 ± 0.01				
P4 R. EtOH				3.92 ± 0.02		2.15 ± 0.05
P4 R. AcEt.		0.02 ± 0.01			0.79 ± 0.11	
P4 R. Hex.		0.02 ± 0.01				11.94 ± 0.06
P5 1°C H ₂ O/EtOH	17.97 ± 0.04	0.67 ± 0.14				0.02 ± 0.01
P5 1°C EtOH	4.79 ± 0.02	0.35 ± 0.01		1.49 ± 0.03	10.09 ± 0.02	12.82 ± 0.88
P5 1°C AcEt.		0.08 ± 0.01	7.71 ± 0.02		12.63 ± 0.03	17.86 ± 0.08
P5 1°C Hex.						
P5 2°C H ₂ O/EtOH	22.29 ± 0.06	0.86 ± 0.08				0.38 ± 0.01
P5 2°C EtOH	3.56 ± 0.12	0.29 ± 0.06			6.63 ± 0.06	4.67 ± 0.01
P5 2°C AcEt.	2.86 ± 0.06	0.09 ± 0.01	1.75 ± 0.01	1.79 ± 0.05		
P5 2°C Hex.	1.95 ± 0.05	0.19 ± 0.01		3.17 ± 0.04		
P5 3°C H ₂ O/EtOH	3.03 ± 0.04					
P5 3°C EtOH	0.47 ± 0.01	0.18 ± 0.02	1.17 ± 0.01	1.61 ± 0.02		2.33 ± 0.09
P5 3°C AcEt.		0.06 ± 0.01				0.37 ± 0.02
P5 3°C Hex.		0.11 ± 0.03				
P5 4°C H ₂ O/EtOH	6.41 ± 0.07	0.14 ± 0.05				
P5 4°C EtOH		0.05 ± 0.01			16.12 ± 0.08	4.81 ± 0.03
P5 4°C AcEt.						
P5 4°C Hex.						
P5 R. H ₂ O/EtOH	2.34 ± 0.07					
P5 R. EtOH		0.02 ± 0.01				
P5 R. AcEt.						
P5 R. Hex.						12.49 ± 0.09
P6 1°C H ₂ O/EtOH	13.17 ± 0.02	0.47 ± 0.05				
P6 1°C EtOH		0.14 ± 0.01	5.32 ± 0.03		7.61 ± 0.06	5.82 ± 0.01
P6 1°C AcEt.	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	8.72 ± 0.03		16.17 ± 0.04	
P6 1°C Hex.		0.11 ± 0.01		2.11 ± 0.02		

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Elast. % Inhib.
P6 2°C H ₂ O/EtOH	18.68 ± 0.06	0.54 ± 0.04	0.97 ± 0.01			4.17 ± 0.05
P6 2°C EtOH	9.46 ± 0.05	0.55 ± 0.03		3.03 ± 0.04		3.61 ± 0.01
P6 2°C AcEt.		0.02 ± 0.01	11.58 ± 0.01			
P6 2°C Hex.		0.14 ± 0.01				
P6 3°C H ₂ O/EtOH	12.34 ± 0.05	0.48 ± 0.03				11.48 ± 0.82
P6 3°C EtOH		0.17 ± 0.01				9.79 ± 0.07
P6 3°C AcEt.		0.06 ± 0.01	9.62 ± 0.02			
P6 3°C Hex.		0.08 ± 0.01				
P6 4°C H ₂ O/EtOH	6.39 ± 0.04	0.22 ± 0.06				
P6 4°C EtOH	0.65 ± 0.03	0.02 ± 0.03	10.41 ± 0.01			4.61 ± 0.02
P6 4°C AcEt.	1.04 ± 0.06	0.09 ± 0.01				18.23 ± 0.09
P6 4°C Hex.		0.04 ± 0.01	1.08 ± 0.01			12.18 ± 0.11
P6 R. H ₂ O/EtOH						
P6 R. EtOH		0.08 ± 0.01				
P6 R. AcEt.						
P6 R. Hex.						
P7 1°C H ₂ O/EtOH	4.42 ± 0.02	0.17 ± 0.01				
P7 1°C EtOH		0.04 ± 0.01	10.24 ± 0.02		2.51 ± 0.05	4.77 ± 0.02
P7 1°C AcEt.		0.05 ± 0.02			4.76 ± 0.02	1.73 ± 0.05
P7 1°C Hex.		0.02 ± 0.01	1.07 ± 0.01	1.79 ± 0.01		
P7 2°C H ₂ O/EtOH	22.71 ± 0.11	0.39 ± 0.02				
P7 2°C EtOH	1.09 ± 0.05	0.14 ± 0.03	8.87 ± 0.05			3.04 ± 0.03
P7 2°C AcEt.		0.02 ± 0.01				
P7 2°C Hex.		0.12 ± 0.01	9.39 ± 0.05	0.55 ± 0.04		
P7 3°C H ₂ O/EtOH	29.35 ± 0.04	0.95 ± 0.05				4.47 ± 0.03
P7 3°C EtOH	7.87 ± 0.05	0.28 ± 0.04	1.89 ± 0.02		6.16 ± 0.09	
P7 3°C AcEt.		0.02 ± 0.01			7.99 ± 0.03	
P7 3°C Hex.	0.27 ± 0.03	0.11 ± 0.01				
P7 4°C H ₂ O/EtOH	0.29 ± 0.02	0.03 ± 0.02				
P7 4°C EtOH		0.06 ± 0.02		4.02 ± 0.03		2.73 ± 0.02
P7 4°C AcEt.	3.25 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.02			
P7 4°C Hex.	1.63 ± 0.04	0.03 ± 0.01				
P7 R. H ₂ O/EtOH	2.26 ± 0.03	0.19 ± 0.01				
P7 R. EtOH				0.26 ± 0.02		
P7 R. AcEt.	1.11 ± 0.05					
P7 R. Hex.						

M/E	DPPH % A. Antiox.	Pol. mg GAE/g	L-T. % Inhib.	L-DOPA % Inhib.	Lipox. % Inhib.	Elast. % Inhib.
P8 1°C H ₂ O/EtOH	19.25 ± 0.02					
P8 1°C EtOH	6.92 ± 0.01					
P8 1°C AcEt.	3.15 ± 0.01					
P8 1°C Hex.						
P8 2°C H ₂ O/EtOH	12.21 ± 0.06	0.44 ± 0.02	1.84 ± 0.01			0.37 ± 0.01
P8 2°C EtOH	5.05 ± 0.07	0.43 ± 0.01	9.22 ± 0.03	0.04 ± 0.02		
P8 2°C AcEt.	2.44 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.96 ± 0.02		3.96 ± 0.08	14.86 ± 0.96
P8 2°C Hex.						
P8 3°C H ₂ O/EtOH	18.36 ± 0.06	0.62 ± 0.04				
P8 3°C EtOH	2.41 ± 0.08	0.33 ± 0.01		3.45 ± 0.03	9.57 ± 0.07	
P8 3°C AcEt.		0.11 ± 0.01	0.85 ± 0.02			16.61 ± 1.01
P8 3°C Hex.	0.98 ± 0.07	0.11 ± 0.01				
P8 4°C H ₂ O/EtOH	7.03 ± 0.02	0.42 ± 0.09				
P8 4°C EtOH		0.02 ± 0.01		0.11 ± 0.01		1.41 ± 0.09
P8 4°C AcEt.						
P8 4°C Hex.						
P8 R. H ₂ O/EtOH	0.73 ± 0.02	0.09 ± 0.02				4.71 ± 0.03
P8 R. EtOH	1.66 ± 0.07		0.11 ± 0.02			5.41 ± 0.02
P8 R. AcEt.						
P8 R. Hex.						

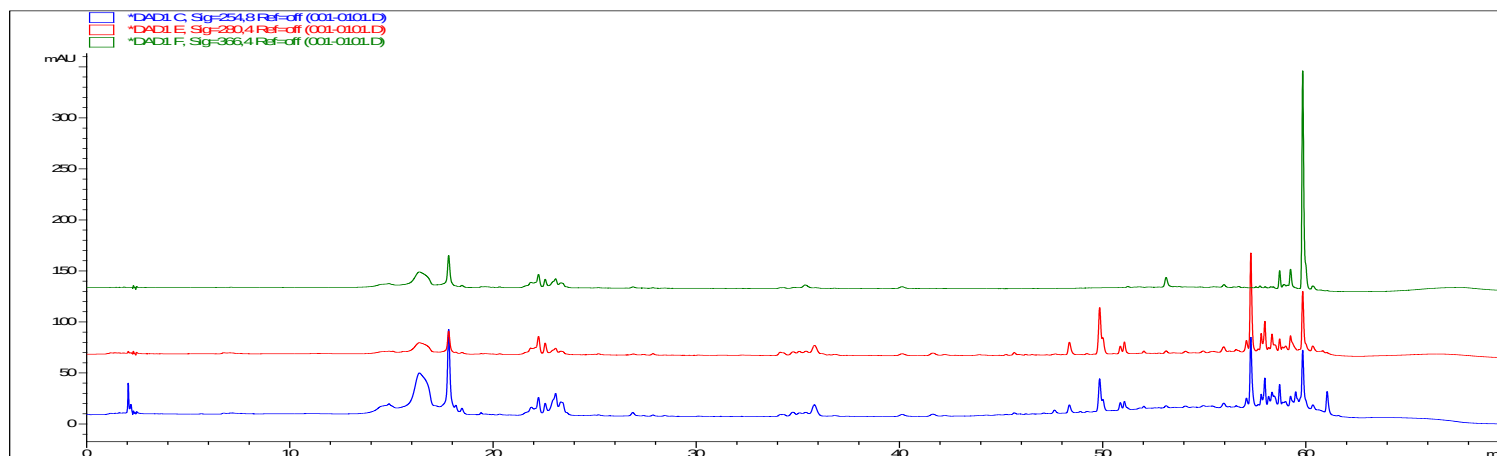
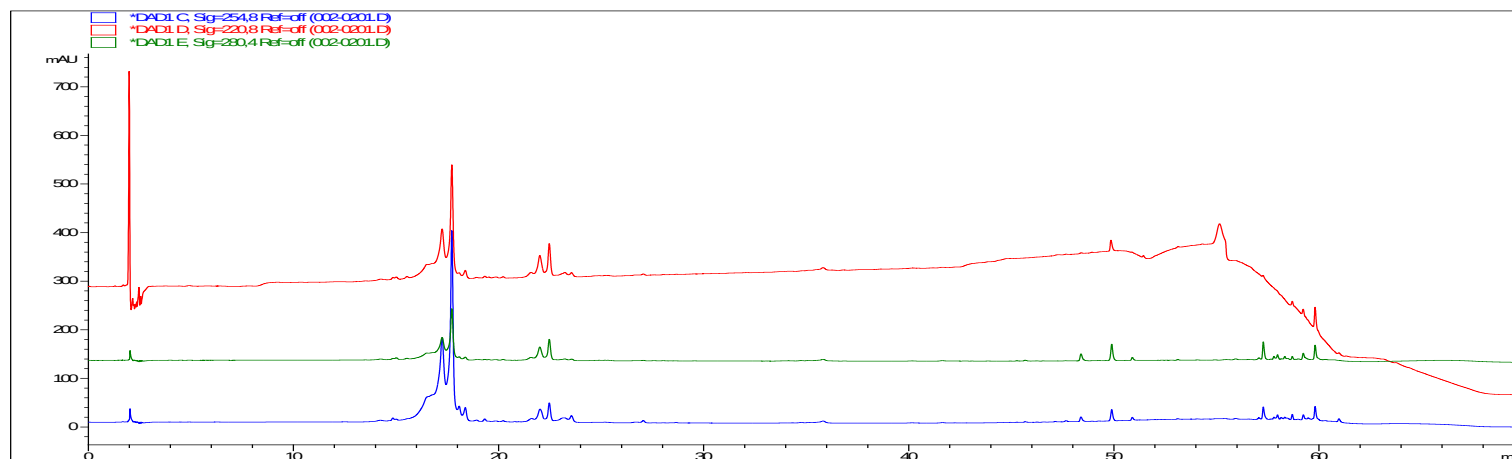


ANEXO IV

ANNEXE IV

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos de la separación cromatográfica empleadas en el análisis de HPLC de las fracciones utilizando una columna C18 Phenomenex, Luna[®] (150 mm x 4.6 mm id, 5 µm), de los extractos de las muestras de las plantas *Hemerocallis* extraída con acetato de etilo y etanol, muestra 46 AcEt y 46 EtOH respectivamente así como la muestra *Lycianthes rantonnetii* extraída con EtOH, muestra 78 EtOH, medidos en un detector de diodo array a 254.8 nm señal azul, 220.8 nm señal roja y 280.4 nm señal verde.

Ci-dessous sont présentés les chromatogrammes obtenus par séparation chromatographique utilisée dans l'analyse HPLC des fractions avec une colonne Phenomenex C18, Luna[®] (150 mm x 4.6 mm id, 5 µm), à partir d'extraits d'échantillons de plantes *Hemerocallis* extrait avec de l'acétate d'éthyle et de l'éthanol, échantillons 46 AcEt et 46 EtOH respectivement, ainsi que l'échantillon *Lycianthes rantonnetii* extrait avec de l'EtOH, l'échantillon 78 EtOH, mesuré dans un détecteur à réseau de diodes à 254.8 nm signal bleu, 220.8 nm signal rouge et 280.4 nm signal vert.

CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N° 46 ACETATO DE ETILO A 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm y 280.4 nm**CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON N° 46 ACÉTATE D'ÉTHYLE À 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm et 280.4 nm****CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N° 46 ETANOL A 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm y 280.4 nm****CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON N° 46 ÉTHANOL À 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm et 280.4 nm**

CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N° 78 ETANOL A 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm y 280.4 nm**CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON N° 78 ÉTHANOL À 3 λ : 254.8 nm, 220.8 nm et 280.4 nm**