

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



Universidad
de Guanajuato

CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN QUÍMICA

"INTERACCIÓN DE ALGUNOS METALES/METALOIDES
CON ÁCIDOS NUCLEICOS: ESTUDIO ANALÍTICO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA:
ARMANDO ALCÁZAR MAGAÑA

GUANAJUATO, GTO., 11 DE DICIEMBRE DE 2015



Universidad
de Guanajuato

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN QUÍMICA

Guanajuato, Gto., 11 de Diciembre de 2015

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título: **"INTERACCIÓN DE ALGUNOS METALES/METALOIDES CON ÁCIDOS NUCLEICOS: ESTUDIO ANALÍTICO"** realizado por el MC. Armando Alcázar Magaña en los laboratorios del Departamento de Química, de la unidad Pueblito de Rocha, de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Doctor en Química bajo la dirección de la Dra. Katarzyna Dorota Wrobel y el Dr. Kazimierz Wrobel.

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Dr. Kazimierz Wrobel

"INTERACCIÓN DE ALGUNOS METALES/METALOIDES CON ÁCIDOS NUCLEICOS: ESTUDIO ANALÍTICO"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA

ARMANDO ALCÁZAR MAGAÑA

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Jorge Albino López Jiménez

Secretario: Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Vocal: Dra. Gertrud Lund

Vocal: Dr. Silvio Zaina

Vocal: Dr. Armando Gómez Ojeda

Suplente: Dra. Eunice Yañez Barrientos

Dedicatoria

A mis padres, a quienes les debo la vida y todo lo que soy.

A mi familia: cualquier cosa que escriba aquí no le hace justicia a la profunda gratitud que siento por ustedes, no se pude ser más afortunado de lo que yo he sido. Mis padres que no tendrán más allá de un certificado de educación primaria, mis hermanos y yo les entregamos un certificado especial, el de ser los mejores padres del mundo. Ustedes nos inculcaron un profundo amor y respeto por el trabajo. Mi padre, un ser humano *í n t e g r o* y trabajador a quien admiro y respeto con todo mi entendimiento; mi madre que no me imagino todo lo que has luchado para sacarnos adelante ante la adversidad con la que crecimos, tú tienes un doctorado en el mejor sentido común que puede haber en una persona. Mis hermanos: Noé, Patricia, Mariana y Gibran, no me imagino mi vida si tan solo faltara alguno de ustedes, sería un rompecabezas incompleto, hemos compartido juntos tantas experiencias.

A mis asesores, es un orgullo presumir que me he formado a su lado. A la Dra. Katarzyna que a veces he pensado en preguntarle de que planeta viene... tanta disciplina y dedicación no se encuentra muy a menudo. Al doctor Kazimierz, a veces una simple charla con usted nos puede poner los pies en la tierra y enfocarnos en cosas importantes. A la Dra. Alma y Eunice por ser parte de este proyecto. A los Doctores Masai, Kamimura y Mackay por su apoyo y enseñanza en las estancias de investigación.

A mis amigos, dicen que se los amigos se pueden contar con los dedos de las manos, yo soy afortunado de ocupar muchas manos más para contarlos.

A la generosa Universidad de Guanajuato y al CONACyT, sin estas dos instituciones, alcanzar esta meta no me hubiese sido posible.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	V
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tablas	XVII
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	4
I.1 Epigenética	4
I.1.1 Eventos epigenéticos	4
I.1.2 Regulación epigenética	7
I.1.3 Papel de metales y metaloides en eventos epigenéticos	8
I.1.4 Efectos epigenéticos de metales/metaloides en forma de nanopartículas	9
I.2 Estrés en organismos vivos	10
I.2.1 Estrés en plantas	11
I.2.2 Diferentes formas de metales/metaloides como agentes causantes de estrés abiótico	16
I.2.3 Estrés oxidativo	19
I.2.4 Formación de ROS	20
I.2.5 Defensa antioxidante	21
I.2.6 Exudación de raíces	22
I.2.7 Compuestos fenólicos en plantas y su posible efecto sobre la metilación del DNA	23
I.3 Espectrometría de masas como herramienta analítica utilizada en el presente proyecto	25
I.3.1 Analizador de masas	26
I.3.2 Espectrometría de masas en tándem	30
I.3.3 Cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS)	31
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	33

II.1. Objetivo general	33
II.1. Objetivos particulares	33
CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL	34
III.1. Equipo de laboratorio	34
III.2. Estándares y reactivos	34
III.3. Software	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
IV.1 Estudio analítico de la modificación del DNA bajo estrés abiótico: caso de pentaclorofenol.	36
IV.1.1 Introducción	36
IV.1.2 Objetivo	37
IV.1.3 Condiciones experimentales	37
IV.1.4 Resultados y discusión	37
IV.1.5 Conclusiones	40
IV.2 Estudio comparativo de nanopartículas de selenio elemental y de ion selenito en la planta <i>Lepidium sativum</i> con enfoque en los compuestos fenólicos y en la metilación global del DNA	42
IV.2.1 Introducción	42
IV.2.2 Objetivo	43
IV.2.3 Condiciones experimentales	44
IV.2.4 Resultados y discusión	51
IV.2.5 Conclusiones	75
IV.3 Desarrollo de un procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-ITMS y su aplicación al análisis de muestras reales derivadas de plantas	77
IV.3.1 Introducción	77
IV.3.2 Objetivo	75
IV.3.3 Condiciones experimentales	78

IV.3.4 Resultados y discusión	81
IV.3.4.1 Puesta a punto del procedimiento	81
IV.3.4.2 Aplicación en el análisis de tequilas	87
IV.3.4.3 Aplicación en el análisis de exudados de plantas en etapa de embriogénesis somática	93
IV.3.5 Conclusiones	95
IV.4 Desarrollo de un nuevo procedimiento analítico basado en el acoplamiento de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem para evaluación del grado de metilación global de ácidos nucleicos en <i>Lepidium sativum</i> expuesto a nanopartículas de óxido de cobre.	96
IV.4.1 Introducción	96
IV.4.2 Objetivo	98
IV.4.3 Condiciones experimentales	99
IV.4.4 Resultados y discusión	103
IV.4.5 Conclusiones	122
IV.5 Aplicación de cromatografía de líquidos en acoplamiento con espectrometría de masas en tándem para el análisis de modificaciones de ácidos nucleicos en <i>Lepidium sativum</i> expuesto a nanopartículas de óxido de cobre.	124
IV.5.1 Introducción	124
IV.5.2 Objetivo	124
IV.5.3 Condiciones experimentales	125
IV.5.4 Resultados y discusión	125
IV.5.5 Conclusiones	145
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	146
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
CAPÍTULO VII. ANEXOS	164
ANEXO I. REPORTE DE ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN	164

VII.1 Characterization of the <i>ligA</i> and <i>ligB</i> homologs, which encode a putative protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase of <i>Sphingobium sp.</i> strain SYK-6	165
VII.1.1 Introduction	165
VII.1.2 Objctive	169
VII.1.3 Materials and methods	169
VII.1.4 Results and discussion	175
VII.1.5 Conclusions	188
VII.2 Analysis of DNA binding by myelin transcription factor 1 four zinc fingers	189
VII.2.1 Introduction	189
VII.2.2 Objctive	191
VII.2.3 Materials and methods	191
VII.2.4 Results and discussion	201
VII.2.5 Conclusions	216
ANEXO II. ARTÍCULOS PUBLICADOS	220

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenosina
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citidina
CAT	Catalasa
CI	Ionización química
CIAP	Fosfatasa alcalina
CID	Disociación inducida por colisión
Cm	2'-O-metilcitidina
CNL	Perdida neutra contante
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CuO NPs	Nanopartículas de óxido de cobre (II)
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de arreglo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dA	2'-desoxiadenina
dC	2'-desoxicitidina
DL	Límite de detección
dG	2'-desoxiguanosina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
DSL	Dispersión de luz dinámica
ECD	Disociación por captura electrónica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Impacto de electrones
EIC	Cromatogramas de iones extraídos
ESI	Electronebulización
ETD	Disociación por transferencia electrónica
FLD	Detector de fluorescencia
FT-ICR	Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
G	Guanosina
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en llama
Gm	2'-O-metilguanosina
GPx	Glutación peroxidasa
5hmdC	5-hidroximetil-2'-desoxicitidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a masas
I	Inosina
ICP-MS	Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente
io ⁶ A	N ⁶ -(cis-hidroxiisopentenil)adenosina
ISTD	Estándar interno
ITMS	Detector de masas de trampa iónica
m ¹ A	1-metiladenosina
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
m ⁶ dA	N ⁶ -metil-2'-deoxiadenosina

5mC	5-metil-2'-citidina
3mC	3-metilcitidina
5mdC	5-metil-2'-desoxicitidina
7mG	7-metilguanosina
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
m ¹ G	1-metilguanosina
m ² G	N-metilguanosina
MM	Masa molecular
MRM	Monitoreo de reacciones selectivas o múltiples
msio ⁶ A	2-metiltio-N ⁶ -(<i>cis</i> -hidroxiisopentenil) adenosina
MSTFA	N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida
NOM	Norma oficial Mexicana
NPSe	Nanopartículas de selenio
Ψ	Pseudouridina
PCA	Análisis multivariante por método de componentes principales
PCP	2,3,4,5,6-pentaclorofenol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QL	Límite de cuantificación
R	Coefficiente de correlación
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Desviación estándar relativa
RT	Temperatura ambiente
SA	Adición de estándar
SAH	S-adenosil L-homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
S ² C	Tiocitidina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Embriogénesis somática
SIM	Monitoreo selectivo de iones
SOD	Superóxido dismutasa
SPS	Ajuste de parámetros inteligente
S/N	Relación señal ruido
T	Timidina
tRNA	RNA de transferencia
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
Tris-HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
TOF	Tiempo de vuelo
U	Uridina
UPLC-ESI-ITMS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas con ionización por electronebulización
UV-VIS	Ultravioleta visible

Estancia de investigación

1D	One dimensional
Amp	Ampicillin

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-FTICR	Electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance
GST	Glutathione-S-transferase
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRV 3C	Human rhinovirus 3C protease
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani broth
LC-MS	Liquid chromatography mass-spectrometry
MALLS	Multi-angle laser light scattering
MBP	Maltose binding protein
MQW	Milli-Q® water
MS	Mass spectrometry
MST	Microscale thermophoresis
MyT1 _{F4-7}	Myelin transcription factor 1(ZnF4-ZnF7)
NEAA	Non-essential amino acids
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PEI	Polyethylenimine
SEC	Size exclusion chromatography
ZnFs	Zinc fingers

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura	Descripción	Página
Figura 1.1	Representación del cambio del metabolismo ante la percepción del estrés. Tomado del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Uruguay.	12
Figura 1.2	Representación de los eventos críticos en la respuesta de las plantas al estrés ocasionado por factores abióticos.	12
Figura 1.3	Representación general de las curvas de toxicidad de los diferentes elementos presentes en las plantas. Adaptación de P.H.T Beckett y <i>col.</i>	16
Figura 1.4	Factores de estrés que conllevan a la producción de especies reactivas de oxígeno en plantas expuestas. Adaptado de Omar Borsani y <i>col.</i>	20
Figura 1.5	Esquema simplificado del rango cubierto por las técnicas de ionización a presión atmosférica. Adaptado de Bruker Daltonics.	26
Figura 1.6	Esquema simplificado de la ionización por electronebulización en modo positivo.	28
Figura 1.7	Esquema simplificado de una trampa de iones. Tomado de Bruker Daltonics.	29
Figura 1.8	Diagrama simplificado de la espectrometría de masas en tándem. Los iones de la primera ronda (MS1) son selectivamente fragmentados y analizados en la siguiente ronda (MS2) para dar un espectro característico del ion seleccionado.	31
Figura 4.1	Cromatograma de la reacción entre TCpBQ (12.29 min) y desoxiguanosina (4.35 min), obteniéndose la formación del aducto Cl ₂ BQ-dG (11.41 min).	38
Figura 4.2	Cromatograma típico HPLC-DAD de la fracción correspondiente al aducto dG-Cl ₂ BQ (Figura 4.1), con su correspondiente espectro de absorción.	38
Figura 4.3	Efecto del porcentaje del DMSO (v/v) en el medio de la reacción sobre el rendimiento de la síntesis del aducto Cl ₂ BQ-dG a 68°C.	39
Figura 4.4	Típico cromatograma obtenido para la separación del aducto dG-Cl ₂ BQ y estándares (2mg L ⁻¹) de desoxinucleósidos, nucleósidos y 5-metilcitolina, detección en DAD a 260 nm.	40
Figura 4.5	Distribución del tamaño de las NPSe, análisis realizado mediante dispersión de luz dinámica (DSL), el tamaño promedio observado para las NPSe fue de 126 nm	45
Figura 4.6	Espectro de absorción UV-VIS registrado en la solución después de diálisis, conteniendo NPSe.	45
Figura 4.7	Esquema del fraccionamiento de los compuestos fenólicos en biomasa: F1 – compuestos fenólicos libres, F2 – solubles, unidos a glicósidos y F3 – insolubles, unidos a la pared.	49
Figura 4.8	<i>L. sativum</i> expuesto 7 días a diferentes concentraciones de NPSe.	52

Figura 4.9	<i>L. sativum</i> expuesto 7 días a diferentes concentraciones de Se(IV).	53
Figura 4.10	Imagen comparativa de <i>L. sativum</i> expuesto por 7 días a 10, 50 y 100 mg L ⁻¹ tanto de NPSe como de Se(IV).	54
Figura 4.11	Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la parte aérea de <i>L. sativum</i> control, 10 mg L ⁻¹ de NPSe y 10 mg L ⁻¹ de Se(IV).	55
Figura 4.12	Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la parte aérea de <i>L. sativum</i> control, 100 mg L ⁻¹ de NPSe y 100 mg L ⁻¹ de Se(IV).	55
Figura 4.13	Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la raíz de <i>L. sativum</i> control, 10 mg L ⁻¹ de NPSe y 10 mg L ⁻¹ de Se(IV).	56
Figura 4.14	Cromatogramas típicos HPLC-DAD/FLD de una mezcla de 19 estándares (arriba) y 9 en otra corrida por separado (abajo) concentración 2.5 mg L ⁻¹ cada uno, con detección DAD (280 nm) y FLD (Ex=305, Em=436).	57
Figura 4.15	Cromatograma HPLC-DAD/FLD típico del medio de cultivo de berros expuestos por una semana a 100 mg L ⁻¹ de Se(IV) detección DAD (280 nm, línea sólida) y FLD (Ex=305, Em=436, línea punteada).	58
Figura 4.16	Graficas de cuantificación de los compuestos identificados en el medio de cultivo de berros a diferentes concentraciones de Se(IV). Las condiciones de detección se muestran en la Tabla 4.4.	59
Figura 4.17	Área de compuestos no identificados, los cuales varían su concentración en función de la concentración de Se(IV) a la que fueron expuestas las plantas.	60
Figura 4.18	Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 12 compuestos determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10, 35, 50 y 100 mg L ⁻¹ . (a) Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y (b) gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.	61
Figura 4.19	Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 8 compuestos identificados y determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10, 35, 50 y 100 mg L ⁻¹ . a- Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y b- gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.	62
Figura 4.20	Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 12 compuestos determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10 y 35 mg L ⁻¹ . (a) Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y (b) gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.	62
Figura 4.21	Esquema de la correlación encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica en el medio de cultivo para concentraciones de Se (IV) de 0.5, 2, 10 y 35 mg L ⁻¹ así como el control.	64

Figura 4.22	Típicos cromatogramas HPLC-FLD obtenidos en el análisis de la fracción F1 (fenólicos libres) de parte aérea y de raíces de berros expuestos por una semana a 35 mg L ⁻¹ de Se(IV), detección FLD (Ex=305, Em=436).	65
Figura 4.23	Típicos cromatogramas HPLC-DAD obtenidos en el análisis de la fracción F1 (fenólicos libres) de parte aérea y de raíces de berros expuestos por una semana a 35 mg L ⁻¹ de Se(IV), detección DAD 254 nm.	66
Figura 4.24	Análisis de PCA para F1, F2 y F3 de la parte aérea de las plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	69
Figura 4.25	Esquema de la correlación de encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica para F1 de la parte aérea de plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	70
Figura 4.26	Análisis de PCA para F1, F2 y F3 de la raíz de las plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control	70
Figura 4.27	Esquema de la correlación de encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica para F1 de raíz de plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	72
Figura 4.28	Efecto de Se(IV) sobre el porcentaje de metilación global de DNA en <i>Lepidium sativum</i> .	73
Figura 4.29	Estructura de los compuestos fenólicos analizados	80
Figura 4.30	Cromatograma de iones extraídos (EIC) para una solución de calibración con 34 compuestos fenólicos (0.5 mg L ⁻¹ cada uno), el nombre de cada compuesto numerado se muestra en la Figura 4.29. a) - modo ESI negativo, valores <i>m/z</i> 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177 y 197. b) - modo ESI positivo, valores <i>m/z</i> 195, 151 y 147.	84
Figura 4.31	Cromatograma de iones extraídos para una solución de calibración con 34 compuestos fenólicos en dos niveles de concentración: 1.0 y 2.5 mg L ⁻¹ línea sólida y semicontinua respectivamente. El nombre y estructura de cada compuesto numerado se muestra en la Figura 4.29. a) - modo ESI negativo, valores <i>m/z</i> 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177 y 197. b) - modo ESI positivo, valores <i>m/z</i> 195, 151 y 147.	85
Figura 4.32	Cromatograma de iones extraídos seleccionados (<i>m/z</i> 167, 137, 153, 169, 181) obtenidos para un tequila reposado “R2” (línea sólida) y para la misma muestra después de la adición de estándares (línea semicontinua, 0.15 mg L ⁻¹ de cada compuesto).	89
Figura 4.33	Cromatograma de pico base obtenidos para tequila blanco (línea sólida), reposado (línea punteada) y añejo (línea semicontinua) de la misma marca (muestras B4, R5 y A1, respectivamente).	92
Figura 4.34	Cromatograma de iones extraídos seleccionados de compuestos fenólicos encontrados en mCM. a) - Compuestos detectados en ESI negativo. b) - Cafeína detectada en ESI positivo.	94
Figura 4.35	Espectro de masas en modo <i>full scan</i> adquirido para las diferentes citosinas inyectadas al sistema HPLC-ESI(+)-ITMS (20 ng cada uno) y	105

	los cromatogramas de iones extraídos adquiridos para cada compuesto en su forma de dímero protonado (2M+H) ⁺ o monómero protonado (M+H) ⁺ . El nombre de cada compuesto se indica sobre la figura.	
Figura 4.36	Estructuras de homodímeros protonados para los diferentes compuestos que contienen citosinas.	106
Figura 4.37	Efecto de la amplitud de fragmentación en la relación S/N de 11 nucleósidos obtenidos para ESI alternado (10 ng cada uno).	108
Figura 4.38	Cromatograma típico obtenido para una solución estándar de los 11 compuestos (1 ng cada uno). a) MRM basado en dos transiciones: C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126. b) MRM basado en una transición: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136.	109
Figura 4.39	Cromatogramas HPLC-ESI-ITMS obtenidos para soluciones de calibración en modo MS ³ . Las cantidades correspondientes para cada inyección se muestran en la Figura.	110
Figura 4.40	Espectro de masa <i>full scan</i> adquirido para hidrolizados de DNA (<i>L. sativum</i> expuesto a CuO NPs 1000 mg L ⁻¹ ; 6.79 a 6.92 min). a) Ácidos nucleicos lavados con batocuproina b) Sin lavado (se amplifica patrón isotópico característico de cobre).	111
Figura 4.41	Cromatogramas obtenidos para hidrolizados de ácidos nucleicos de plantas expuestas a CuO NPs antes y después de adición de estándar (0.5 ng de cada compuesto en la columna, descripción mostrada en parte experimental). a) <i>L. sativum</i> crecido en presencia de CuO NPs 1000 mg L ⁻¹ ; condiciones MS ² (C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136) b) <i>L. sativum</i> crecido en presencia de CuO NPs 50 mg L ⁻¹ ; condiciones MS ³ (C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126).	112
Figura 4.42	Panel izquierdo- cromatograma HPLC-ESI-ITMS para diferentes cantidades de DNA de salmón inyectada al sistema (las cantidades inyectadas se indican en la figura de acuerdo al tipo de línea). Panel derecho- efecto de la masa de DNA inyectada sobre la señal de 5mdC (área de pico, línea sólida) y porcentaje metilación del DNA de salmón (línea semicontinua). (SD basada en 3 réplicas). a) MRM en condiciones MS ² ; dC 455/228, 5mdC 483/242 b) MRM en condiciones MS ³ ; dC 455/228/112, 5mdC 483/242/126	115
Figura 4.43	Efecto de la masa de ácidos nucleicos inyectada al sistema HPLC-ESI-ITMS ³ para <i>L. sativum</i> expuesto a 250 mg L ⁻¹ de CuO NPs (SD basada en 3 réplicas). a) MRM en condiciones MS ³ ; C 487/244/112, dC 455/228/112, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126	116

	<p>b) Señal para 5mdC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de DNA inyectada así como sus respectivos porcentajes de metilación de DNA evaluados (línea semicontinua)</p> <p>c) Señal para 5mC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de RNA inyectada así como sus respectivos porcentajes de metilación de RNA evaluados (línea semicontinua).</p>	
Figura 4.44	<p>Efecto de la masa de ácidos nucleicos inyectada al sistema HPLC-ESI-ITMS² para <i>L. sativum</i> expuesto a 250 mg L⁻¹ de CuO NPs (SD basada en 3 réplicas).</p> <p>a) Cromatogramas MRM: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, 5mC 515/258, 5mdC 483/242.</p> <p>b) Señal para 5mdC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de DNA inyectada con sus respectivos porcentajes de metilación de DNA evaluados (línea semicontinua)</p> <p>c) Señal para 5mC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de RNA inyectada con sus respectivos porcentajes de metilación de RNA evaluados (línea semicontinua).</p>	117
Figura 4.45	Efecto de la concentración de CuO NPs agregadas al medio de crecimiento en la longitud de las partes aéreas y raíces de <i>L. Sativum</i> .	118
Figura 4.46	Fotos de cultivos de <i>L. sativum</i> bajo diferentes condiciones de exposición con sus respectivos resultados para clorofila (unidades SPAD ± SD, 15 hojas).	119
Figura 4.47	<p>Efecto de CuO NPs sobre el porcentaje de metilación global de ácidos nucleicos en <i>L. sativum</i>. Comparación mediante procedimientos HPLC-ESI-ITMS², HPLC-ESI-ITMS³ y HPLC-DAD.</p> <p>a) Metilación global de DNA</p> <p>b) Metilación total de RNA</p>	121
Figura 4.48	Típico cromatograma de pico base obtenido del análisis HPLC-ESI-ITMS de hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (250 mg L ⁻¹).	126
Figura 4.49	Cromatograma HPLC-ESI-CNL para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L ⁻¹). CNL de 116 Da (línea sólida) para pérdidas de desoxiribosa y 132 Da (línea semicontinua) para ribosa.	128
Figura 4.50	a- EIC para <i>m/z</i> de 298; b- Cromatograma de pérdidas neutras constantes de 132 Da (línea sólida, ribosa) y 146 Da (línea semicontinua, 2'-O-metilribosa) para DNA de berros expuestos a CuO NPs (250 mg L ⁻¹). El nombre de cada nucleósido se muestra en la Tabla 4.23.	128
Figura 4.51	<p>a- Comparación de patrón isotópico del nucleósido con tiempo de elución 14.6 min (compuesto referido como 33) después de su pérdida neutra de 132 Da (línea semicontinua) con su patrón teórico (línea sólida) para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L⁻¹); b- EIC <i>m/z</i> 352 para diferentes condiciones de exposición a CuO NPs (tipo de línea y concentración de cada exposición mostrado en la Figura); c- patrón de fragmentación MS² (arriba) y MS³ (abajo); d- esquema de fragmentación sugerida para io⁶A.</p>	130

Figura 4.52	a- Comparación de patrón isotópico del nucleósido 34 (línea semicontinua) con su patrón teórico (línea sólida) para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L ⁻¹); b- EIC para <i>m/z</i> de 398 (tipo de línea y concentración de cada exposición mostrado en la Figura).	131
Figura 4.53	a- Cromatograma de valores <i>m/z</i> extraídos para el análisis HPLC-ESI-ITMS de hidrolizados de ácidos nucleicos extraídos de berros expuestos a CuO NPs (1000 mg L ⁻¹). 1 306, 2 245, 3 247, 4 282, 5 487, 6 298, 7 455, 8 245, 9 515, 10 342, 11 515, 12 346, 13 483, 14 537, 15 284, 16 300, 17 259, 18 268, 19 298, 20 298, 21 243, 22 298, 23 268, 24 252, 25 312, 26 282, 27 282, 28 413, 29 282, 30 266, 31 427, 32 296, 33 352, 34 398, 35 336. El nombre de los nucleósidos asignados se presenta en la Tabla 4.23. b- Cromatograma de valores <i>m/z</i> extraídos para una inyección de 5 µL de una mezcla de 18 estándares que contenía la siguiente concentración de nucleósidos: 3mC 258, 17.5 mg L ⁻¹ ; 2 245, 6.25 mg L ⁻¹ ; 4 282, 6.25 mg L ⁻¹ ; 5 487, 12.5 mg L ⁻¹ ; 6 298, 6.25 mg L ⁻¹ ; 7 455, 2.5 mg L ⁻¹ ; 8 245 6.25 mg L ⁻¹ ; 9 515, 25 mg L ⁻¹ ; S²C 260 2.5 mg L ⁻¹ ; 11 515, 5 mg L ⁻¹ ; 13 483, 2.5 mg L ⁻¹ ; 14 537, 6.25 mg L ⁻¹ ; 15 284, 6.25 mg L ⁻¹ ; 17 259, 12.5 mg L ⁻¹ ; 18 268, 2.5 mg L ⁻¹ ; 21 243, 2.5 mg L ⁻¹ ; 23 268, 2.5 mg L ⁻¹ ; 24 252, 2.5 mg L ⁻¹ . El nombre de los nucleósidos se presenta en la Tabla 4.23.	133
Figura 4.54	a- EIC para <i>m/z</i> 300 (nucleósido 16, Tabla 4.23) para diferentes condiciones de exposición de <i>L. sativum</i> a CuO NPs. b- Relación de área de pico 16 con respecto al área de guanosina dependiendo de la concentración de NPs CuO en el medio de cultivo.	139
Figura 4.55	a- Cromatogramas de ion extraído para nucleósidos que presentan una CNL de 194. 1 <i>m/z</i> 306, 12 <i>m/z</i> 346. b- Espectro MS/MS del compuesto 1 para hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (1000 mg L ⁻¹); c- Espectro MS/MS del compuesto 12 para hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (1000 mg L ⁻¹); d- Relación de áreas de picos 1 y 12 con respecto al área de G.	140
Figura 4.56	a- EIC para <i>m/z</i> 266 (nucleósido 30, Tabla 4.23) para diferentes condiciones de exposición de <i>L. sativum</i> a CuO NPs. b- Relación de área del pico 30 con respecto al área de dG.	142
Figura 4.57	Relación de área de algunas modificaciones detectadas con respecto al área de G para cuatro diferentes concentraciones de CuO NPs. La <i>m/z</i> utilizada para cada EIC se muestra en la Tabla 4.23.	144
<hr/> Estancia de investigación <hr/>		
Figure 7.1	Catabolic pathway for the degradation of lignin-derived aromatics by <i>Sphingobium</i> sp. strain SYK-6 (Laboratory of Microbial Metabolic Engineering NUT).	166
Figure 7.2	Catabolic pathways for the degradation of lignin-derived aromatics by <i>Sphingobium</i> sp. strain SYK-6 (Laboratory of Microbial Metabolic Engineering, NUT).	167
Figure 7.3	Transcriptional regulation of the PCA catabolic genes in SYK-6. Transcription of the <i>ligJABC</i> and <i>ligKUI</i> genes are activated by LigR in the presence of PCA or GA.	167

Figure 7.4	Location of the PCA 4,5-dioxygenase gene (<i>ligAB</i>) homologs in the SYK-6 genome (left) and amino acid sequence identities of each homologous gene (right).	168
Figure 7.5	Genetic organization of <i>SLG_37530</i> (small subunit) and <i>SLG_37520</i> (large subunit). Primers used for the construction of expression and disruption of the gene(s) are boxed with orange and pink, respectively.	171
Figure 7.6	Restriction enzyme and gene map of the <i>SLG37520-30</i> expression plasmid, pET52030.	172
Figure 7.7	Restriction enzyme and gene map of <i>SLG_37520</i> disruption plasmid, pAK520D.	175
Figure 7.8	Agarose gel electrophoresis of the PCR products from SYK-6.	176
Figure 7.9	Left, schematic representation for the introduction of the amplified fragment into pET-16b. Right, agarose gel electrophoresis of the 1.3 Kb-fragment and pET-16b digested by <i>Nde</i> I and <i>Bam</i> HI.	176
Figure 7.10	Agarose gel electrophoresis of the isolated plasmids (left) and their <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI digests (right).	177
Figure 7.11	DNA sequencing of the candidate expression plasmid (clone 2). Blue and green arrows indicate the coding region of <i>SLG_37530</i> and <i>SLG_37520</i> , and sequenced region, respectively.	177
Figure 7.12	SDS-PAGE analysis of protein production in <i>E. coli</i> BL21(DE3). Lanes: 2, 4, and 6 h of induction by the addition of 1 mM IPTG. Cell extract of <i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-16b vector was used as a control (shown as Ctr.). Soluble and insoluble fractions are indicated by “S” and “Is”, respectively.	178
Figure 7.13	SDS-PAGE analysis of protein production in <i>E. coli</i> BL21(DE3). Lanes: 1, control (pET-16b); 2, 3 and 4, transformant cells with pregrowth before the addition of IPTG; 5, 6, and 7, transformant cells without pregrowth before the addition of IPTG. M, protein size marker with sizes in kDa.	179
Figure 7.14	SDS-PAGE analysis of protein fractions. Lanes: M, 1, molecular mass markers; JM109(DE3) with pET-16b; 2, SoluBL21(DE3) with pET-16b; 3, BL21 Star(DE3) with pET-16b; 4, JM109(DE3) with pET52030; 5, SoluBL21(DE3) with pET52030; and 6, BL21 Star(DE3) with pET52030. Soluble and insoluble fractions are indicated by “s” and “i” at the top of each lane, respectively.	179
Figure 7.15	SDS-PAGE analysis of protein fractions. Lanes: M, molecular size markers; 1, JM109(DE3) with pET-16b; 2, JM109(DE3) with pET52030 induced for 4 h at 30°C; 3, JM109(DE3) with pET52030 induced for 24 h at 16°C. Soluble and insoluble fractions are indicated by “s” and “i” at the top of each lane, respectively.	180
Figure 7.16	SDS-PAGE analysis of protein fractions after enzyme purification by His Spintrap. a, fractions eluted with different concentrations of imidazole in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 500 mM NaCl; b, fractions	181

eluted with different concentrations of imidazole in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 mM NaCl.

Figure 7.17	Chromatograms of PCA, caffeic acid, GA, and 3MGA. The chromatographic conditions are given in materials and methods	182
Figure 7.18	Left, conversion of GA and PCA. Right, specific activities of the crude enzyme. Activity assay conditions are given in materials and methods.	183
Figure 7.19	Schematic representation of overlapping PCR to generate an <i>SLG37520</i> deleted fragment. At first, top and bottom fragments were produced, and then overlapping PCR was performed using resultant fragments and primers, 1 and 4, to connect both fragments.	184
Figure 7.20	Agarose gel electrophoresis of the top and bottom fragments amplified by first PCR (left) and the fragment generated by overlapping PCR (right). Annealing temperatures for PCR are shown on the gel.	184
Figure 7.21	Agarose gel electrophoresis of candidates for the <i>SLG_37520</i> disruption plasmid. Isolated plasmids (right) and the plasmids digested with EcoRI and BamHI (left) were separated. Vector control (pAK405) is shown as "C".	185
Figure 7.22	LB plate after the triparental mating. Candidates for single crossover strains were grown on a LB containing nalidixic acid ($12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and kanamycin ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$).	186
Figure 7.23	Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products using genomic DNA of candidates for the double crossover strains. Two amplified fragments were observed from the clones 1, 6, 7 and 8. The clone 3 showed only a deleted fragment. G, Genomic DNA of SYK-6.	186
Figure 7.24	Agarose gel electrophoresis of PCR products digested by HincII. HincII digests from the double crossover strain should be 1.5- and 0.5-kb fragments while those from the single crossover strain should be 1.5-, 1.0- (or 1.1-), and 0.5-kb fragments.	187
Figure 7.25	Growth of the <i>SLG_37520</i> mutant on syringate and vanillate.	188
Figure 7.26	Schematic representation of mouse Myt1 gene.	190
Figure 7.27	A, Agarose gel electrophoresis of the digested vectors and B, agarose gel electrophoresis of digested PCR product of MyT1 _{F4-7} .	202
Figure 7.28	Western blot of pcDNA3.1- MyT1 _{F4-7} construct expressed in HEK293FT cells.	203
Figure 7.29	SDS-PAGE analysis of protein expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) A, MBP- MyT1 _{F4-7} and B, GST- MyT1 _{F4-7} both at 20 °C.	204
Figure 7.30.	Peptide score distribution for trypsin digested MyT1 _{F4-7} . Ion score is $-10\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.	205

Figure 7.31	Purification of MyT1 _{F4-7} by SEC followed by cation exchange. Better results were obtained by switching the separation order (cation exchange followed by size exclusion, Figure 7.32).	205
Figure 7.32	Purification of MyT1 _{F4-7} by cation exchange followed by SEC.	206
Figure 7.33	¹ H NMR spectrum of MyT1 _{F4-7} . The spectrum was acquired at RT °C on a 800 MHz spectrometer, before (red line) and after flash-freezing and thawing (blue line).	207
Figure 7.34	SEC-MALLS analysis of MyT1 _{F4-7}	208
Figure 7.35	Purification of ¹⁵ N- MyT1 _{F4-7} by cation exchange followed by SEC. Fractions under box area were pooled for HSQC.	209
Figure 7.36	Purification of ds Hes1 and Stt3b by cation by SEC, fractions corresponded under box area were pooled for HSQC experiments.	209
Figure 7.37	¹⁵ N-HSQC spectra recorded of MyT1 _{F4-7} following the addition of 0 (blue) and 0.25 (red) molar equivalents of ds Hes1 (5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'). Titration was carried out in SEC buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM TCEP). Spectra were recorded at 800 MHz and RT.	210
Figure 7.38	¹⁵ N-HSQC spectra recorded of MyT1 _{F4-7} following the addition of 1 molar equivalents of Hes1 (5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'). Titration was carried out in SEC buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM TCEP). Spectra were recorded at 800 MHz and RT.	211
Figure 7.39	¹ H NMR spectrum of MyT1 _{F4-7} following the addition of 0 (blue), 0.25 (red) and 0.5 (green) molar equivalents of ds Hes1. The spectrum was acquired at RT °C on an 800 MHz spectrometer.	211
Figure 7.40	SEC-MALLS analysis of A) HES1 and B) MyT1 _{F4-7} -Hes1 interaction (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0 at RT)	212
Figure 7.41	Purification of ds Fl-Hes1 and Fl-Stt3b by cation by SEC, fractions under the boxed area were pooled for MST assays.	213
Figure 7.42	MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1 _{F4-7} . Red triangles and black marks are a duplicate experiment in a 2:1 dilution; meanwhile the blue diamonds are a 3:1 dilution of the stock solution (Fl-Hes1 concentration was fixed at 20 nM; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT).	214
Figure 7.43	MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1 _{F4-7} with fit shown. (Fl-Hes1 concentration was fixed at 20 nM in a 2:1 dilution of MyT1 _{F4-7} ; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT). The reliability of this fit is not high because the first binding event is affected by other interaction events at higher concentrations.	214
Figure 7.44	MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1 _{F4-7} with fit shown. (Fl-Stt3b concentration was fixed at 20 nM in a 2:1 dilution of MyT1 _{F4-7} ; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT).	215

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Descripción	Página
Tabla 1.1	Estudios de efectos epigenéticos causados por nanopartículas.	10
Tabla 1.2	Elementos esenciales para las plantas, su forma utilizable y el % en tejido seco de las mismas. (Brawn et al. 1987)	15
Tabla 1.3	Las principales funciones de los micronutrientes (Grusak, M.A y col.)	15
Tabla 1.4	Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura básica. Adaptado de Justin N. Kabera y col 2014.	23
Tabla 4.1	Efecto del solvente en el rendimiento de formación del aducto dG-Cl ₂ BQ.	40
Tabla 4.2.	Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos derivados con MSFTA por GC-FID	47
Tabla 4.3.	Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos en medio de cultivo por HPLC-DAD/FLD.	48
Tabla 4.4.	Funciones lineales de calibración de 31 compuestos analizados utilizando el procedimiento HPLC-DAD/FLD.	50
Tabla 4.5	Lista de compuestos utilizados en el análisis de los exudados de <i>L. sativum</i> expuesto a Se(IV), mediante HPLC – DAD/FLD, marcando los tiempos de retención, condiciones de detección y presencia en las muestras reales.	58
Tabla 4.6	Análisis de correlación entre las condiciones de exposición y concentraciones de compuestos fenólicos encontrados en el medio de cultivo para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	64
Tabla 4.7	Concentraciones (µg g ⁻¹ ; biomasa liofilizada) de los compuestos encontrados en fracciones F1, F2 y F3 de biomasa (A- parte aérea, R – raíz) para diferentes condiciones de exposición (0 – 100 mg L ⁻¹ Se(IV))	67
Tabla 4.8.	Análisis de correlación entre los diferentes compuestos encontrados en F1 parte aérea para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	68
Tabla 4.9	Análisis de correlación entre los diferentes compuestos encontrados en F1 de la raíz para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L ⁻¹ así como el control.	71
Tabla 4.10	Porcentaje de metilación de DNA en <i>L. sativum</i> expuesto a Se(IV).	72
Tabla 4.11	Masas moleculares, <i>m/z</i> usados para los cromatogramas de iones extraídos, tiempos de retención y límites de detección/cuantificación.	83
Tabla 4.12	Parámetros analíticos de los 34 compuestos fenólicos analizados utilizando el procedimiento HPLC-ESI-ITMS.	86
Tabla 4.13	Experimento de recuperación (muestra R2, análisis por triplicado): tiempos de retención de los compuestos individuales, promedio de las concentraciones con sus respectivas desviaciones estándar obtenidas sin adición de estándar (no SA) y con adición de estándar (SA, 150 µg L ⁻¹ de cada compuesto) y porcentajes de recuperación R.	90

Tabla 4.14	Promedios y rangos de las concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) de compuestos fenólicos determinados en muestras de tequila mediante HPLC-ESI-ITMS	90
Tabla 4.15	Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados en tequilas blancos, reposados y añejos (B1-B6, R1-R12, A1-A4, respectivamente); los valores promedio de tres replicas se presentan en $\mu\text{g L}^{-1}$ y las celdas sin valor indican que el compuesto no se detectó.	91
Tabla 4.16	Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados en dos muestras independientes de mCM proveniente de <i>C. arábica</i> por HPLC-ESI-ITMS.	95
Tabla 4.17	Parámetros MRM para los compuestos de citosinas (aislamiento con $\Delta m/z \pm 2$, amplitud de fragmentación de 0.5 V)	104
Tabla 4.18	Funciones de regresión lineal evaluadas para los cinco compuestos que contienen citosinas, límites de detección (DL) y límites de cuantificación (QL) evaluados en para MRM en modo MS^2 y MS^3	107
Tabla 4.19	Funciones de regresión lineal evaluadas para Uridina, guanosina, desoxiguanosina, timidina, adenosina y desoxiadenosina; límites de detección (DL) y límites de cuantificación (QL) evaluados en modo MRM para MS^2	108
Tabla 4.20	Resultados obtenidos de la adición de estándar (0.5 ng en columna para cada compuesto) usando condiciones MS^2 y MS^3 .	113
Tabla 4.21	Distribución del cobre en los cultivos hidropónicos de <i>L. Sativum</i> determinado para diferentes concentraciones de CuO NPs agregadas a la solución Hoagland.	119
Tabla 4.22	Asignación de fragmentos detectados durante el análisis MS/MS	132
Tabla 4.23	Lista de los nucleósidos detectados utilizando el procedimiento HPLC-ESI-ITMS ⁿ y la información utilizada para proponer su identidad Se presenta nombre, estructura, tiempos de retención con su respectivo porcentaje de desviación estándar relativa (RSD), valores m/z de $(\text{M}+\text{H}^+)$ y $(2\text{M}+\text{H}^+)$ en caso de la formación del homodímero, fragmento formado después de rompimiento por MS^2 así como su pérdida neutra contante (CNL).	134

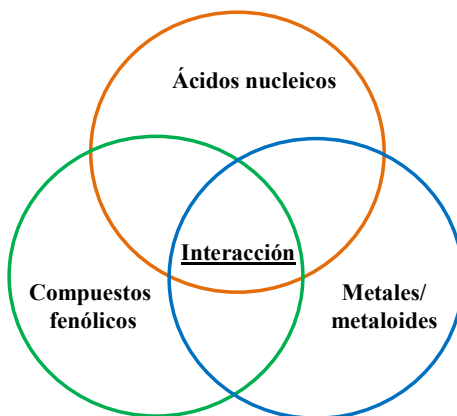
Estancia de Investigación

Table 7.1	Transcriptional induction of <i>ligAB</i> homolog.	168
Table 7.2	PCR conditions for the 1.3 kb fragment.	171
Table 7.3	Conditions tested for the gene expression using pET52030.	173
Table 7.4	PCR conditions for the amplification of <i>SLG_37520</i> disruption fragment.	174
Table 7.5	Proprieties of SLG_37520 and ht-SLG_37530	178
Table 7.6	Analytical parameters evaluated for the target compounds	183
Table 7.7	List of the reagents and consumables used in the study	192
Table 7.8	PCR thermocycler conditions.	195

RESUMEN

Los ácidos nucleicos de todos los organismos vivos pueden sufrir modificaciones, algunas de estas modificaciones son únicas para cada organismo y pueden estar enfocadas a lidiar con el estrés y/o pueden ser esenciales para su supervivencia. En el caso del estrés abiótico, diferentes xenobióticos tales como los metales y metaloides en cualquiera de sus formas incluyendo las nanopartículas, pueden tener un efecto directo (tal es el caso de la formación de aductos) o indirecto (por reacciones tipo redox) en dichas modificaciones. En el caso concreto de las plantas, diferentes xenobióticos pueden desencadenar una serie de modificaciones en sus ácidos nucleicos las cuales están relacionadas con la producción o un cambio en la concentración de metabolitos secundarios en respuesta al estrés al que estén sometidas, entre dichos metabolitos, destaca la presencia de compuestos fenólicos. De esta manera, el estudio de las interacciones entre especies de metales/metaloides con ácidos nucleicos y su efecto/interacción con metabolitos secundarios de tipo fenólico tiene dos enfoques principales en este proyecto de tesis:

1. El desarrollo de metodologías robustas útiles para la detección y cuantificación de metabolitos secundarios de plantas expuestas a metales que pudieran presentar una interconexión con la metilación de ácidos nucleicos especialmente cuando son expuestos a metales/metaloides de acuerdo al siguiente esquema:



2. Contribuir en el avance de conocimientos sobre el posible papel de especies metálicas y de metaloides como desencadenadores de eventos epigenéticos.

El primer capítulo de este trabajo presenta la introducción general al proyecto, donde se abordan temas relacionados con eventos epigenéticos, el estrés en organismos vivos así como una

breve descripción de las técnicas mencionadas a lo largo del documento. En el capítulo II se hace referencia a los objetivos generales y particulares. En el capítulo III se presenta la información general concerniente al equipo de laboratorio utilizado, los estándares y reactivos así como el software utilizado.

El capítulo IV describe 5 secciones de estudios realizados para cumplir con los objetivos planteados, cada una de ellas puntualiza de manera específica el estudio realizado con una breve introducción, los objetivos específicos, condiciones experimentales así como la discusión de resultados con sus correspondientes conclusiones. En la sección IV.1 de este capítulo, se describe el estudio de la interacción directa del principal metabolito de un pesticida ampliamente utilizado (pentaclorofenol) con ADN. Para el estudio de interacciones indirectas entre estrés abiótico y metilación de ácidos nucleicos, se adoptó el procedimiento de cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica y fluorimétrica (HPLC-DAD/FLD) enfocándose en la evaluación del posible efecto de nanopartículas de selenio y del ion selenito sobre metabolitos secundarios de tipo fenólico en plantas de *Lepidium sativum* expuestas, descrito en la sección IV.2. Asimismo, se determinó el grado de metilación global en las plantas expuestas.

Ante la necesidad de contar con un procedimiento para estudiar los metabolitos secundarios de las plantas, de mayor selectividad y más simple respecto a HPLC-DAD/FLD, el apartado IV.3 describe el desarrollo de un nuevo procedimiento de análisis utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con trampa iónica, demostrando su viabilidad en la cuantificación de más de 30 pequeños compuestos fenólicos típicamente reportados en plantas, la mayoría de ellos ácidos fenólicos. Este procedimiento fue utilizado para la determinación de compuestos fenólicos en productos obtenidos a partir de agave (tequilas) así como en el análisis de exudados de plantas de café en etapa de embriogénesis.

Haciendo uso de las ventajas que ofrece la separación en cromatografía de líquidos acoplada a un detector de másico de tipo trampa iónica, la sección IV.4 describe el desarrollo de un procedimiento analítico para evaluar el grado de metilación de ácidos nucleicos en extractos de plantas expuestas a nanopartículas de CuO. Dicho procedimiento permitió además detectar algunas otras modificaciones de ácidos nucleicos de *L. sativum* expuesto a dichas nanopartículas (sección IV.5).

Los estudios realizados nos permitieron generar una serie de conclusiones particulares que se presentan al final de cada sección del capítulo IV. Las conclusiones generales se presentan en el capítulo V y las referencias bibliográficas en el VI.

Finalmente, en el capítulo VII, se presentan dos anexos. En el primero de ellos, se presentan los resultados obtenidos en dos estancias de investigación en las que se hizo uso de técnicas de biología celular complementarias a las técnicas analíticas utilizadas en este proyecto. En la primera de estas estancias, se realizó un estudio del metabolismo de compuestos fenólicos en *Sphingobium* sp. cepa SYK-6 mientras que la segunda de ellas se enfocó en el papel de biometales en procesos epigenéticos, caso específico del zinc. El anexo II presenta los artículos publicados durante la realización del proyecto de doctorado.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ácidos nucleicos pueden sufrir un gran número de modificaciones, algunas de las cuales pueden presentarse como respuesta al estrés abiótico ocasionado por diferentes xenobióticos. Los agentes del estrés abiótico pueden causar modificaciones de ácidos nucleicos de manera directa o indirecta. En el caso de la interacción directa, algunos xenobióticos pueden ocasionar modificaciones a los ácidos nucleicos mediante la formación de aductos con alguno de los componentes de los ácidos nucleicos, ya sea sobre las nucleobases, el azúcar o en los grupos fosfato; se puede mencionar aquí la formación de aductos con algunos derivados de fungicidas como es el caso de la tetracloro-p-benzoquinona, la cual se une a la desoxiguanosina [1]. En el caso de los efectos indirectos de los xenobióticos, como son los metales o metaloides, estos pueden desencadenar una serie de reacciones enzimáticas o de tipo redox que pueden llevar a disparar un gran número de modificaciones con diferente grado de complejidad [2-5], llegando a afectar la producción de metabolitos secundarios como es el caso de los compuestos fenólicos. Los procesos que se acaban de mencionar, sus intermediarios y productos, pueden favorecer las modificaciones de ácidos nucleicos. Es importante destacar que los metales/metaloides pueden ocasionar estrés en los organismos vivos y afectar el ciclo celular en diferente grado, dependiendo de la especie con la que están en contacto con los organismos, ya sea si están presentes en forma iónica o de nanopartículas en su forma mineral [6-8].

I.1 Epigenética

I.1.1 Eventos epigenéticos

El término epigenética se refiere al área de investigación centrada en el estudio de los fenotipos estables heredables que son resultado de los cambios en la estructura de la cromatina, sin modificaciones de la secuencia del DNA [9]. Así pues el término epigenética ha sido definido como "*los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin que se lleve a cabo una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA*" [10]. La epigenética se enfoca en los mecanismos que regulan cómo y cuándo ciertos genes son encendidos o apagados. Se conocen diferentes tipos de mecanismos involucrados en eventos epigenéticos que afectan la conformación

actual de la cromatina, entre ellos la metilación del DNA, la participación de RNAs no codificantes (siRNA, miRNA), diferentes modificaciones de las histonas (acetilación, fosforilación, deaminación, metilación, ubiquitinización) entre otros.

Metilación de DNA

Los ácidos nucleicos, son los responsables de almacenar y traducir el código genético, y para ello están sujetos a una extensiva modificación química [11]. Estas modificaciones ocurren en todos los organismos conocidos [12] y en sus células pueden realizar modificaciones discretas para hacer cambios específicos en algunos nucleótidos de esta manera, las modificaciones de los ácidos nucleicos son muy comunes y pueden ocurrir en la base nitrogenada, en el azúcar y/o en los fosfatos [13]. Es de hacer notar que estas modificaciones pueden ir desde simples isomerizaciones hasta la adición de otras biomoléculas como amino ácidos. Muchas de las modificaciones están bien caracterizadas estructuralmente; sin embargo, se conoce muy poco de sus funciones. En el contexto de este trabajo cabe señalar que algunas modificaciones de ácidos nucleicos han sido implicadas en la regulación epigenética de la actividad transcripcional.

De todos los eventos epigenéticos estudiados, el grado de metilación es probablemente el mejor caracterizado y consiste en la metilación reversible del DNA que en los mamíferos ocurre en el carbono 5 del grupo citosínico del DNA [14]. El grado de metilación se puede evaluar bajo dos enfoques, (1) la metilación gen-específica, que proporciona información del estado de metilación de una región promotora o un gen particular, y (2) la metilación global, que nos brinda información concerniente al estado general de la metilación distribuida a lo largo de todo el genoma y ha sido evaluada como un indicador de los efectos epigenéticos a gran escala en plantas y animales bajo diferentes condiciones fisiológicas. Se ha demostrado que tanto la información sobre el estado actual de la metilación global del DNA, como la información sobre la localización de citosinas metiladas en promotores específicos de genes, son útiles como biomarcadores de cambios epigenéticos y estos dos parámetros han sido evaluados en varios sistemas experimentales [15-20]. Por lo que respecta a este proyecto de investigación, el enfoque ha sido sobre el *porcentaje de metilación global de DNA*, el cual está definido como la relación molar entre las citidinas metiladas y las citidinas totales provenientes del DNA, $5\text{mdC}/(5\text{mdC}+\text{dC})\cdot 100$, este mismo concepto se aplica para la metilación del RNA. Cabe mencionar que la metilación en los mamíferos se limita a secuencias CG simétricas [21] mientras que en plantas se lleva a cabo en secuencias CG, CHG (H puede ser A, C o T) y CHH. En el DNA existen regiones donde la citosina está unida mediante

un fosfato a una guanina en la secuencia lineal de los nucleótidos conocidas como *sitios CpG*, en algunas regiones se pueden presentar agrupaciones de estos sitios formando zonas conocidas como *islas CpG* y son definidas como regiones con al menos 200 pares de bases donde el contenido de C+G es mayor al 50% [22]. Si bien la metilación del carbono 5 del grupo citosínico en el DNA es la modificación más estudiada, existen también otras posibles modificaciones. Recientemente se demostró que la N⁶-metil-2'-deoxiadenosina (m⁶dA) se localiza cerca de los sitios del comienzo de la transcripción, principalmente en el dinucleótido ApT y actúa en la regulación epigenética de células eucariotas [23-25].

Modificación de RNAs

En el caso del ácido ribonucleico, su composición química y sobre todo la diversidad estructural/funcional entre moléculas de diferentes tipos de RNA, le permiten jugar muchos papeles dentro de los sistemas biológicos. Durante la maduración del RNA, algunas enzimas son capaces de introducir modificaciones químicas en los ribonucleótidos con la finalidad de que estos alcancen sus formas activas. La abundancia y ubicación de estas modificaciones varía considerablemente dependiendo del organismo, de los factores medioambientales y de las condiciones de crecimiento [5]. A la fecha, más de cien modificaciones de ribonucleósidos han sido encontradas en diferentes tipos de organismos [5], las más abundantes de ellas afectan a los RNAs ribosomales (rRNA) y de transferencia (tRNA). Dichas modificaciones químicas son una de las propiedades evolutivas más conservadas de los RNAs y se han logrado reveladores avances en el entendimiento de sus diversos papeles en los organismos vivos. A este respecto, se ha propuesto que las modificaciones en el tRNA están involucradas en la respuesta celular al estrés y que las células son capaces de degradar de manera específica o discriminar enzimáticamente los RNAs que no tengan estas modificaciones [2-4]. A pesar de estos avances, la posible relación entre las modificaciones covalentes del RNA y el estrés causado por metales/metaloideos ha sido muy poco estudiada [26-29]. Cabe sin embargo señalar que algunos autores han considerado la metilación de RNA en C5 de la citosina como un potencial elemento de la regulación de la herencia epigenética [30]. En particular, se ha reportado que los niveles de metilación del tRNA en levadura están reguladas por la composición de nutrientes [31]. Se ha propuesto que la metilación del RNA no codificante podría tener un papel similar en eventos epigenéticos como lo tiene la metilación del DNA [32].

I.1.2 Regulación epigenética

Para entender el funcionamiento del genoma de los diferentes organismos, se requiere más allá de conocer su secuencia concreta de los miles de millones de nucleótidos de su genoma, debido a que hay otros factores que determinan la manera en que funcionan los genes. A pesar de que las células somáticas de un organismo multicelular tienen básicamente la misma información genética, no obstante, cada uno de los tipos celulares que forman parte del organismo tiene una estructura y función particular. Esto se debe a la expresión diferencial del genoma, la cual es regulada principalmente por eventos epigenéticos [33]. En el caso del ser humano, cada célula de nuestro cuerpo contiene los ~22,000 genes que componen nuestro genoma, pero sólo utiliza una porción de ellos para su funcionamiento normal. El resto de los genes se mantienen en 'silencio' mediante diversos eventos epigenéticos. En este sentido, los eventos epigenéticos son un componente crucial de la regulación de la expresión génica [14, 34-36]. Debido a que la metilación del DNA en los promotores de los genes suprime la expresión génica, la correlación entre la expresión génica y la metilación del DNA se ha investigado en diversos tejidos. Estudios sobre metilación global del DNA sugieren que ésta es esencial para la regulación de la expresión de algunos genes específicos de tejido tanto en mamíferos [37] como en plantas [38]. En el caso específico del tipo silvestre de la planta *Arabidopsis*, la metilación está restringida a sitios CG mientras que para su mutante *ibm1*, el DNA también está metilado en sitios CHG [39]. Así mismo, se ha sugerido que el número total de citosinas metiladas y el perfil de los sitios específicos de dicha metilación, en los organismos juega un papel importante en respuesta a las condiciones ambientales, su adaptación y evolución [40, 41].

En cuanto a las modificaciones covalentes de histonas, se han caracterizado la acetilación, fosforilación, desaminación, metilación y ubiquitinización. Todas estas modificaciones son postraduccionales y contribuyen en la conformación actual de la cromatina regulando de esta manera la accesibilidad de los factores de transcripción. En estudios en plantas se ha reportado que la modificación de las histonas funciona como regulador epigenético, demostrándose que la expresión génica está promovida por la acetilación, fosforilación y ubiquitinización, modificaciones que favorecen la conformación relajada de la cromatina [42]. Cabe también mencionar que existe una asociación entre la metilación del DNA y modificaciones de las histonas

y que ambos tipos de eventos epigenéticos tienen una acción conjunta en el silenciamiento/activación de la expresión génica [43].

Debido a que los eventos epigenéticos, por una parte, juegan un papel vital en los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo del organismo, en su estabilidad genómica y también en los procesos a nivel de evolución, existe una fuerte demanda de herramientas que permitan caracterizar cualitativa y cuantitativamente los marcadores de eventos epigenéticos. De relevancia para este trabajo de tesis es el estudio de la participación de diferentes formas de metales/metaloides en eventos epigenéticos.

I.1.3 Papel de los metales y metaloides en eventos epigenéticos

Los metales pesados son contaminantes persistentes en el medio ambiente, así que pueden acumularse provocando efectos adversos en la mayoría de los organismos. En el caso de las plantas, el proceso de captación de metales involucra la acción de agentes quelatantes, solubilizadores o agentes que modifiquen la biodisponibilidad del metal en el suelo, los cuales forman complejos que pueden ser transportados al interior de los tejidos. Numerosos estudios sugieren que los cambios epigenéticos son la ruta crítica mediante la cual algunos metales/metaloides producen los efectos tóxicos [44]. Bajo ciertas condiciones, los metales pueden interactuar con la cromatina, en el núcleo se unen al DNA y a proteínas provocando la oxidación de bases y pérdida de las mismas, roturas de dobles hélices y formación de puentes DNA-proteína. Los metales también pueden afectar la fidelidad de la replicación del DNA mediante la inhibición de enzimas y síntesis de nucleótidos, alteración de los procesos de metilación y/o del complejo de replicación del DNA, lo que puede llevar a una modificación de la expresión génica. Aunado a esto, la baja mutagenicidad y alta carcinogénesis de los metales/metaloides también sugiere su potencial involucramiento en las modificaciones de las histonas y la metilación del DNA como mecanismos de la oncogénesis [45]. En el caso específico del arsénico inorgánico, se ha observado la hipermetilación de promotores de genes y la alteración en la metilación global de histonas H3 [46, 47]. Recientemente se ha propuesto que algunos metales no esenciales incluso cuando se presentan en muy bajas concentraciones, son capaces de suprimir la regulación de la estructura de la cromatina, la diferenciación celular y la proliferación controlada de células madres de ratón [48]. Aunque el papel de los metales/metaloides en el contexto de la epigenética ha sido estudiado

principalmente en animales superiores y humanos, existen también evidencias de su similar acción en otros tipos de organismos como son levaduras [49], lombrices de tierra [50] y plantas [51-53]. En el contexto de este trabajo de investigación, es importante mencionar que algunos elementos metálicos y metaloides han sido implicados en eventos epigenéticos [44]. En particular, en numerosos estudios se han observado cambios en la metilación del DNA y en la acetilación de histonas por la exposición de los organismos a compuestos de arsénico, cromo, níquel, entre otros [46, 47, 54-56]. Por otro lado, los cambios en la metilación del DNA en presencia de los compuestos de selenio (selenito, selenometionina), fueron relacionados con la interacción directa entre especies de Se y DNA-metiltransferasas. Así mismo, diferentes formas del selenio han cobrado mucha importancia tanto en biología celular como en química analítica, principalmente por su actividad en la prevención del cáncer. De esta manera, en el contexto la epigenética, el papel del selenio en procesos de biometilación parece ser importante [44]. Se observó también que la metilación *in vivo* del arsénico afectó los niveles celulares de los agentes requeridos para la metilación del DNA [57]. A pesar de varios reportes encontrados en la bibliografía sobre la asociación de metales/metaloides con los cambios epigenéticos, la información sobre posibles interacciones de metales/metaloides con especies participantes a nivel molecular es escasa [44].

I.1.4 Efectos epigenéticos de metales/metaloides en forma de nanopartículas

Se conoce que los nanomateriales tienen efectos biológicos diferentes a los presentados por otras especies de los mismos componentes. La presencia ubicua de nanopartículas junto a la creciente evidencia que las vincula con efectos negativos en los organismos vivos conlleva a la necesidad de estudiar los mecanismos por los cuales se producen dichos efectos [58]. En la etapa inicial, el estudio de las nanopartículas se enfocó a evaluar los efectos de estos materiales sobre los perfiles de la expresión génica sin relacionarlo con las modificaciones epigenéticas. Recientemente estos estudios se están orientando a investigar el posible papel de las nanopartículas como factores epigenéticos [59]. Algunos de estos estudios se muestran en la Tabla 1.1.

En el presente trabajo se aborda el estudio de los efectos de las nanopartículas en organismos vivos; con base en la revisión bibliográfica se incluye la evaluación de estos materiales como posibles elementos epigenéticos, en el contexto de su capacidad para inducir cambios en la metilación de los ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos ayudarán en la mejor comprensión de

la participación de eventos epigenéticos en la respuesta de los organismos al estrés abiótico. Cabe resaltar que la metilación del DNA juega un papel importante en la regulación de la expresión génica o guiando otros mecanismos epigenéticos para que estos funcionen en el momento y lugar adecuados, sin embargo aún quedan muchas interrogantes.

Tabla 1.1 Estudios de efectos epigenéticos causados por nanopartículas.

Modelo de estudio	Nanopartículas	Efecto epigenético	Referencia
<i>Metilación de DNA</i>			
Células humanas HaCaT	SiO ₂ NPs	Hipometilación global del DNA	[60]
Células HaCaT	SiO ₂ NPs	Hipermetilación de <i>PARP-1</i>	[61]
<i>Modificación de histonas</i>			
Células MCF7 (Células humanas cancerígenas)	CdTe QDs	Hipoacetilación global	[62]
<i>Expresión de miRNA</i>			
C57BL/6BomTac (células de ratón)	TiO ₂ NPs	Regulación de miR155, miR-1 y miR-135b	[63]
MRC5 (células humanas)	Au NPs	Regulación de miR155, condensación de la cromatina	[64]
Células NIH/3T3 (fibroblastos de ratón)	MW-CNTs	Desregulación de la expresión de miRNA	[7]
Células NIH/3T3	CdTe QDs	Alteración global de los patrones de expresión de miRNA	[64]
<i>Nicotiana Tabacum</i> (planta)	Al ₂ O ₃ NPs	Incremento en la expresión de miRNA	[6]

I.2 Estrés en organismos vivos

En organismos vivos, el término estrés se refiere a la alteración del metabolismo celular inducida por factores exógenos, la cual tiene un impacto en su desarrollo y fisiología. Dichos factores pueden ser otros organismos como bacterias, plantas, hongos, parásitos o insectos y es denominado como estrés biótico, o bien puede ser ocasionado por factores no vivos y pueden ser elementos medioambientales como la radiación solar, el viento, temperatura, sequías, inundaciones, pH, la presencia de xenobióticos tales como los metales/metaloideos, etc. El estrés es una parte inherente del ciclo de vida de todos los organismos vivos; diversas modificaciones de los ácidos nucleicos y sus consecuencias en la salud están relacionados con diferentes tipos de estrés. Los factores estresantes abióticos inducen cambios considerables en las plantas a nivel fisiológico y molecular,

para esto, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación (entre ellos la síntesis de metabolitos secundarios), orientados a tolerar el estrés en los que las modificaciones epigenéticas juegan un papel primordial.

El daño oxidativo al DNA es una consecuencia inevitable del metabolismo celular, y es provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que pueden provenir de varias fuentes. Independientemente de su origen, las ROS pueden interactuar con biomoléculas como el DNA, produciendo modificaciones que pueden ser potencialmente importantes para las células [65].

1.2.1 Estrés en plantas

En las plantas, el genoma puede responder de una manera rápida y dinámica al estrés de manera que pueda sobrellevar las restricciones de una secuencia de DNA altamente estable. En condiciones del estrés, el metabolismo primario de las plantas se debilita para fortalecer la biosíntesis de un amplio rango de compuestos protectores contra el estrés, llamados metabolitos secundarios (Figura 1.1). Un ejemplo de este tipo de sustancias son compuestos fenólicos que confieren a la planta la actividad antioxidante y cuyas concentraciones aumentan considerablemente en algunas plantas sometidas a estrés [66].

El estrés abiótico normalmente disminuye el porcentaje de metilación global del DNA, sin embargo el efecto de los metales pesados y/o metaloides es específico de cada especie [51]. El estrés biótico por otro lado tiene dos efectos contrastantes, 1) la hipermetilación global y 2) la hipometilación de genes relacionados a la resistencia [67]. Estos fenómenos pueden contribuir en la adaptación de las plantas al estrés. Cabe señalar que los patrones de metilación heredables junto las variaciones en el fenotipo que surjan en respuesta al estrés pueden ser de utilidad para futuras generaciones [68].

La sobrevivencia de las plantas en las condiciones del estrés depende de su habilidad de adaptación y defensa. En la Figura 1.2 se presentan esquemáticamente los posibles escenarios. En particular, los mecanismos de tolerancia y adaptación se basan en cambios en el proteoma que permiten establecer una nueva homeostasis celular.

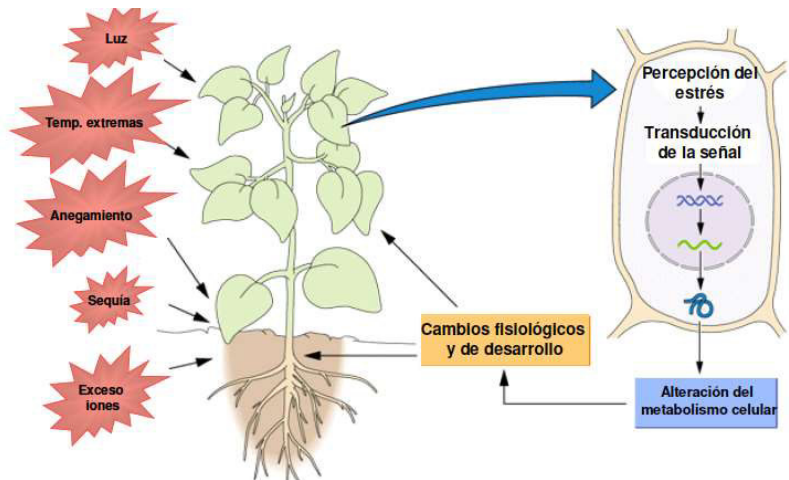


Figura 1.1 Representación del cambio del metabolismo ante la percepción de diversos factores medioambientales. Tomado de Borsani, Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Uruguay [69].

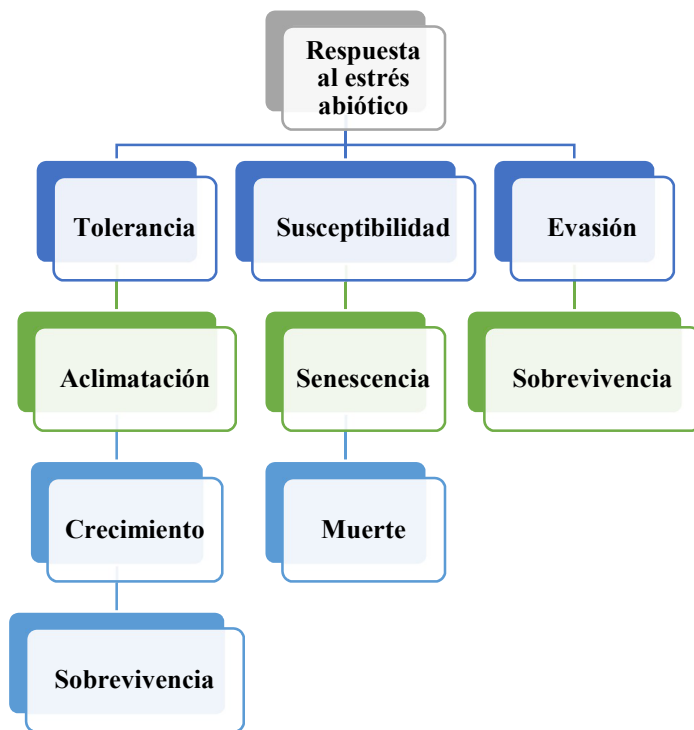


Figura 1.2 Representación de los eventos críticos en la respuesta de las plantas al estrés ocasionado por factores abióticos [69]

El estrés abiótico es responsable de producir especies reactivas de oxígeno peligrosas para las células. A continuación, se mencionan algunos de los factores más importantes relacionados con el estrés abiótico en plantas:

Frio

Se ha encontrado que el frío disminuye el porcentaje de metilación de las raíces del maíz [67]. En las plantas de tabaco, su principal impacto es en la disminución de la catálisis enzimática, resultando en un desequilibrio metabólico que debilita sobre todo la defensa antioxidante; el frío también induce deshidratación y daño en membranas. En respuesta a este tipo de estrés la planta puede acumular compuestos como aminoácidos y azúcares que ayudan a estabilizar membranas y proteínas y retener el agua además de la inducción de proteínas de protección [70].

Sequías

Es el principal factor de estrés abiótico que provoca la deshidratación celular y relacionados con ello cambios en el metabolismo celular, en su mayoría asociados al ajuste osmótico [71].

Salinidad

El incremento en la concentración de varios iones (principalmente Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , CO_3^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-}) en el suelo conlleva a la disminución de toma del agua y micronutrientes por la raíz [72].

Inadecuadas condiciones de luz

Las plantas son organismos fotosintéticos, por lo que la luz juega un papel crucial en sus vidas, la irradiación tiene efectos cruciales en los procesos primarios de fotosíntesis [73].

Deficiencia o exceso de elementos esenciales

Las plantas están compuestas de 94 a 99.5% de tres elementos, carbono, hidrógeno y oxígeno. La mayor parte del carbono y del oxígeno lo obtienen del aire, mientras que el hidrógeno procede del agua. Además de estos elementos, las plantas contienen y necesitan cierto número de elementos químicos. Estos elementos constituyen la fracción mineral y representan una pequeña fracción de la masa seca de la planta (0.5-6%), estos elementos junto a carbono, hidrógeno y oxígeno, son esenciales para la nutrición de las plantas. Existen 17 elementos con los cuales las plantas pueden sintetizar todos los compuestos que necesitan. Estos elementos esenciales son: molibdeno, níquel, cobre, zinc, manganeso, boro, hierro, cloro, azufre, fósforo, magnesio, calcio, potasio, nitrógeno, oxígeno, carbono e hidrógeno. Se consideran esenciales si cumplen con alguno de los siguientes criterios:

1. Cuando en ausencia de determinado elemento la planta no puede completar su ciclo biológico.
2. La acción del elemento debe ser específica, es decir, ningún otro elemento puede sustituirlo totalmente.
3. El elemento debe estar implicado directamente en la nutrición vegetal, bien como constituyente de un metabolito esencial, o que sea requerido para el funcionamiento de un enzima.

En la Tabla 1.2, se muestran los elementos esenciales, su forma disponible a las plantas y el porcentaje en masa seca que tienen en el tejido de las plantas.

Los primeros ocho elementos de la Tabla 1.2, se denominan micronutrientes debido a que sus concentraciones en tejidos están por debajo de los 100 mg kg^{-1} de materia seca, mientras que los nueve restantes se requieren en concentraciones mayores a 1000 mg kg^{-1} de materia seca y se les denomina macronutrientes. Sin embargo estas concentraciones pueden variar de una especie a otra así como por su etapa de crecimiento.

Además de los elementos citados en la Tabla 1.2, se han descubierto elementos que indican un efecto positivo en el crecimiento de algunas especies vegetales (elementos benéficos), mientras que otros parecen ser esenciales para especies específicas. El hecho de que las concentraciones de los micronutrientes sean mucho más bajas en comparación con los macronutrientes en las plantas implica que tienen un papel diferente en el crecimiento y metabolismo de las planta. Esta diferencia de concentración se refleja en función de que son constituyentes de los grupos protéticos en las metaloproteínas y como activadores de reacciones enzimáticas, lo que permite que estos catalicen procesos redox. Los micronutrientes también forman complejos enzimáticos ligando enzimas con sus sustratos. Al momento se conocen también varios micronutrientes que están presentes en las enzimas superóxido dismutasa, las cuales actúan para erradicar el oxígeno, protegiendo las biomenbranas, DNA, clorofila y proteínas. Las principales funciones de los micronutrientes se presentan en la Tabla 1.3.

Tabla 1.2 Elementos esenciales para las plantas, su forma utilizable y el % de masa del tejido seco de las mismas. (Brawn y col. 1987)

Elemento	Forma utilizable por la planta	% en tejido seco
Micronutrientes		
Molibdeno	MoO ₄ ²⁻	0.00001
Níquel	Ni ²⁺	0.0001
Cobre	Cu ⁺ , Cu ²⁺	0.0006
Zinc	Zn ²⁺	0.002
Manganeso	Mn ²⁺	0.005
Hierro	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	0.01
Boro	H ₃ BO ₃	0.002
Cloro	Cl ⁻	0.01
Secundarios		
Azufre	SO ₄ ²⁻	0.1
Magnesio	Mg ²⁺	0.2
Calcio	Ca ²⁺	0.5
Primarios		
Fósforo	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	0.2
Potasio	K ⁺	1
Nitrógeno	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	1.5
Estructurales		
Oxígeno	O ₂ , H ₂ O, CO ₂	45
Carbono	CO ₂	45
Hidrógeno	H ₂ O	6

Tabla 1.3. Las principales funciones de los micronutrientes (Grusak y col. 2001) [74]

Micronutriente	Función
Fe, Mn, Cu, Ni	Constituyentes de enzimas (metaloproteínas)
Mn, Zn	Activación de enzimas
Fe, Cu, Mn, Cl	Involucrados en el transporte de electrones en la fotosíntesis
Mn, Zn, Mo	Involucrados en la tolerancia al estrés
Cu, Mn, Zn, B	Involucrados en el crecimiento reproductivo
B, Zn	Constituyentes de paredes y membranas celulares

El desarrollo normal de las plantas puede verse severamente alterado cuando la concentración de elementos (esenciales o no) presente en estado asimilable en la disolución en contacto con las raíces excede de cierto nivel. En cuanto a elementos esenciales, en general, los macronutrientes son mucho menos tóxicos que los micronutrientes. Los márgenes entre el nivel óptimo y la toxicidad de los micronutrientes están muy cercanos, y para algunos, un pequeño exceso puede

originar grandes alteraciones. De manera muy general, el comportamiento de toxicidad está representado en la Figura 1.3. Cabe señalar que los efectos tóxicos dependen del grado de sensibilidad que presente el organismo y puede variar notablemente de una especie a otra.

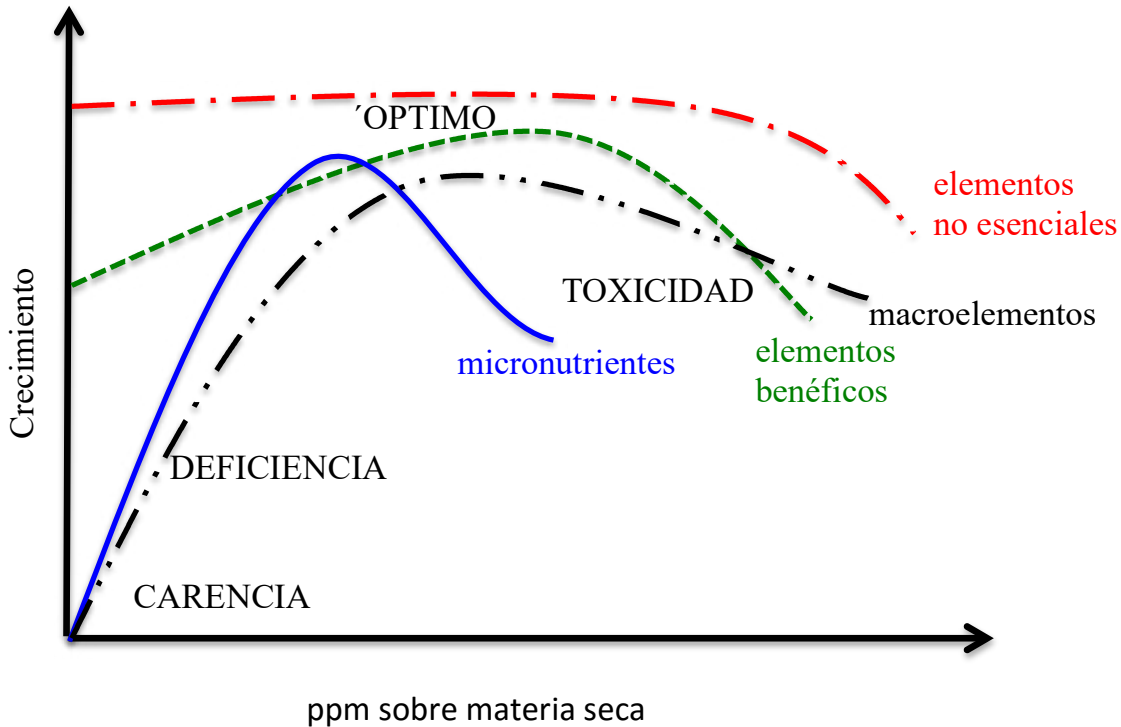


Figura 1.3 Representación general de las curvas de toxicidad de los diferentes elementos presentes en las plantas. Adaptación de Beckett y col. [75].

I.2.2 Diferentes formas de metales/metaloides como agentes causantes de estrés abiótico

Existen muchos factores que son cruciales en la fitotoxicidad de los xenobióticos tales como sus propiedades fisicoquímicas, tamaño molecular y/o de partícula, concentración, etc., lo que los hace más o menos biodisponibles/tóxicos a los organismos. En el caso de los metales/metaloides su toxicidad esta intrínsecamente relacionada con la especie en que estén presentes y se describen brevemente a continuación.

Metales/metaloides

Aunque las plantas necesitan esencialmente sólo unos cuantos elementos minerales en forma de sales, éstas pueden absorber a otros elementos presentes en el suelo o en la disolución nutritiva. Unos sesenta elementos químicos diferentes han sido encontrados en especies vegetales. Entre ellos, los elementos no esenciales como plomo, arsénico, mercurio, litio, cromo, aluminio, silicio, cadmio, selenio etc., son absorbidos principalmente por las raíces. Elevadas concentraciones de algunos de estos elementos pueden acarrear efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas y actuar como factores de estrés [76]. El exceso de algunos metales/metaloides también ha sido relacionado con el aumento del estrés oxidativo. En particular metales como el cobre, cromo y hierro participan directamente en procesos redox, mientras que otros como cadmio, plomo y mercurio provocan la disminución de los niveles de antioxidantes celulares, principalmente por su interacción con el grupo tiol. Algunos metales pesados como cadmio, plomo, mercurio o metaloides como arsénico producen efectos de inhibición en procesos vitales para las células de las plantas debido a que actúan como inhibidores de ciertas enzimas que usan metales como cofactores.

Un caso típico de los metales no esenciales lo constituye el aluminio, que es absorbido por muchas especies vegetales y es causa de alteraciones, sobre todo en suelos de carácter ácido. El selenio constituye otro ejemplo, este elemento se considera benéfico para las plantas ya que ayuda en su crecimiento siempre y cuando se presente en concentraciones relativamente bajas. De manera general, el exceso de selenio es tóxico para las plantas aunque diversas especies llamadas hiperacumuladoras de selenio son capaces de absorber notables cantidades (hasta 10 g Se kg⁻¹ de masa seca [77]) de este elemento sin que presenten síntomas de intoxicación. Estas plantas han sido estudiadas por su utilidad en la fitoremediación (familias *Brassicaceae*, *Amaryllidaceae*).

En el caso de metales pesados, la protección de la planta puede llevarse a cabo al exterior, mediante las asociaciones simbióticas con bacterias y hongos [78]. Los mecanismos propuestos para la tolerancia hacia metales por parte de las micorrizas son similares a los empleados por las plantas superiores, como la captación por compuestos extracelulares. Por otro lado, las paredes celulares de las raíces permiten exudación de compuestos sintetizados por la planta tales como ácidos orgánicos, algunos aminoácidos y péptidos capaces de acomplejar iones metálicos al exterior de la planta y así disminuir su biodisponibilidad [79].

Nanopartículas

Las *nanopartículas* son aquellas partículas cuyo diámetro es menor 100 nm. Actualmente, el uso de la nanotecnología es una práctica común en casi todas las actividades antropogénicas sobre todo en aplicaciones de electrónica, medicina y agricultura, lo que implica la liberación continua de estos nano-materiales al medio ambiente. En ocasiones, las propiedades de los nano- materiales presentan una gran ventaja en comparación con los materiales comúnmente empleados; sin embargo, el uso de la nanotecnología implica nuevos desafíos sobre todo en el ámbito de riesgos toxicológico y medioambiental [80] por lo que es urgente avanzar en el estudio de su impacto en los organismos vivos dado de que la presencia de nanopartículas es cada vez más común en todos los aspectos de la vida. Una amplia variedad de nanopartículas está inundando el mercado, por ejemplo, las nanopartículas de zinc están siendo utilizadas para la fabricación de neumáticos; nanofibras se están empleando para la fabricación de telas con propiedades antimanchas o antiarrugas. Asimismo, cada día se incrementa su uso en cosméticos, fármacos y nuevos tratamientos terapéuticos. En general, el diseño de nuevos nanomateriales para usos que van desde la electrónica, la aeronáutica y toda la industria del transporte están en incremento con la consecuente acumulación de nanopartículas y sus efectos sobre la ecología y la agricultura.

De particular interés en este trabajo se encuentran las nanopartículas de selenio elemental (NPSe) y de óxido de cobre(II) (CuO NPs). Las NPSe han sido introducidas para explorar su actividad biológica, esperando más baja toxicidad respecto a otras formas del elemento. En este caso, un parámetro importante es el tamaño de las NPSe; se ha reportado que las partículas del diámetro de 10-200 nm pueden directamente degradar radicales libres [81]. Por lo que respecta a las nanopartículas de óxido de cobre, éstas han sido aplicadas en diferentes áreas tales como catálisis, baterías, superconductores, conversión de energía solar; así mismo poseen características que las hacen especialmente útiles como fotoconductores al mismo tiempo que incrementan la conductividad térmica de los fluidos utilizados en la conversión de energía térmica/eléctrica [82] por lo que se espera cada vez más su utilización; sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que presentan efectos adversos en el crecimiento y sobrevivencia de algunos organismos [83], la información sobre su efecto en plantas es muy escasa por lo que algunos autores destacan la necesidad de estudiar la respuesta de las plantas cuando son estresadas con CuO NPs [84].

Los estudios sobre estrés abiótico en plantas relacionado con la presencia de diversas formas de metales/metaloides engloban diferentes tópicos, incluyendo la evaluación de la captación de los

agentes estresantes y su metabolización en el organismo por un lado y, por otro lado, caracterización de la respuesta del organismo expuesto, lo que plantea múltiples retos para la química analítica moderna [76]. En relación a este proyecto, previamente ha sido demostrado que tanto los grupos amino como los carboxílicos pueden estabilizar nanopartículas de cobre, sin embargo el estudio no va más allá de la detección de esta interacción mediante espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) [85]. En este sentido, existe gran demanda de procedimientos analíticos que permitan obtener información sobre la interacción de agentes estresantes tales como las nanopartículas y sus efectos en diferentes metabolitos presentes en muestras biológicas ocasionados principalmente como consecuencia del estrés oxidativo.

I.2.3 Estrés Oxidativo

Una de las importantes consecuencias de la exposición de los organismos a los factores externos potencialmente adversos es el *estrés oxidativo*, definido como un desequilibrio entre la formación y neutralización de las llamadas especies oxígeno reactivas. La variedad de factores ambientales que influyen en la sobreproducción de las ROS en plantas se presenta esquemáticamente en la Figura 1.4, la importancia de las ROS es debida a su alta reactividad y toxicidad que afectan prácticamente todas las funciones celulares dañando los ácidos nucleicos, oxidando proteínas, y provocando peroxidación de lípidos y carbohidratos. Queda claro que el estrés oxidativo puede ser incrementado en plantas tanto por el estrés abiótico como biótico (Figura 1.4).

Las ROS se refieren tanto a los radicales libres del oxígeno, como son el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) y el peroxilo, así como a otras moléculas que no son radicales, como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

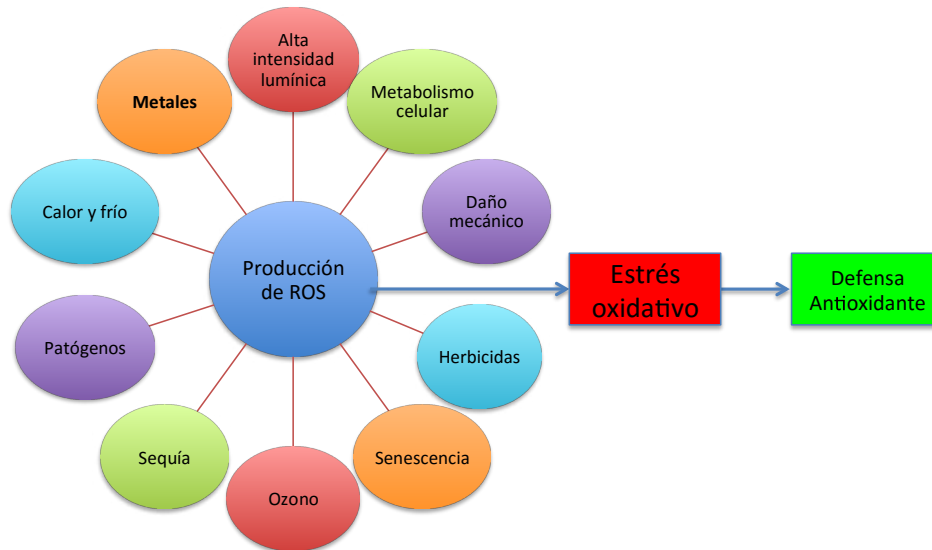


Figura 1.4 Factores de estrés que conllevan a la producción de especies reactivas de oxígeno en plantas expuestas. Adaptado de Borsani y col. [69].

1.2.4 Formación de ROS

Las especies reactivas de oxígeno se generan en todos los organismos vivos como resultado de su metabolismo normal, principalmente en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático. En el caso de las células vegetales, las ROS se generan también en los cloroplastos.

El anión superóxido se forma por dos vías. La no enzimática, en la cual el anión es generado por la acción de metales de transición, tioles, quinonas o flavinas o bien por vía enzimática producido por enzimas tales como la xantina, aldehído oxidasa, citocromo P-450 y NADPH oxidasa. El H_2O_2 es el producto de la dismutación del superóxido o reducción enzimática del O_2 . El radical hidroxilo, es el radical libre más reactivo que existe en los sistemas biológicos; es producido a partir del peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton, o de Haber-Weiss. Ha sido demostrado que las ROS y en particular el radical hidroxilo, inducen los procesos oxidativos de tal manera que el $OH\cdot$ convierte la molécula orgánica “vecina” en un radical libre, por lo general también reactivo, dando inicio a la reacción en cadena.

Entre diferentes factores abióticos que provocan la sobreproducción de las ROS en plantas, se han incluido también algunos tipos de nanomateriales. De manera preliminar se está considerando que el estrés oxidativo inducido por nanopartículas puede ser un importante mecanismo de su toxicidad [86, 87], por lo que este tópico se ha propuesto como el tema de estudio.

I.2.5 Defensa Antioxidante

Se puede considerar como un *antioxidante* cualquier sustancia que disminuye o inhibe la oxidación de un sustrato [88]. En los organismos, la concentración de los antioxidantes debe ser suficiente para prevenir la acumulación de elementos prooxidantes. Debido a la alta reactividad y toxicidad de las ROS, cada organismo cuenta con diferentes niveles de defensa, que permiten mantener un equilibrio entre la formación y neutralización de las ROS, dicha defensa puede ser mediante mecanismos enzimáticos o no enzimáticos.

Como parte de la protección antioxidante por vía enzimática, a continuación se mencionan los principales tipos de enzimas:

Superóxido dismutasa (SOD). Actúa sobre el radical superóxido, transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Existen tres tipos de SOD según el metal que usan como cofactor (Cu/Zn, Mn y Fe)

Peroxidasas. Oxidan compuestos en reacciones fisiológicas y/o eliminan H₂O₂ u otros radicales orgánicos, requiriendo para su acción un aceptor de electrones tal como ascorbato o glutatión.

Catalasa (CAT). Elimina el H₂O₂ sin necesidad de un agente reductor.

Glutatión reductasa. Cataliza la reducción de glutatión disulfuro a glutatión, el cual es crítico en las células para la tolerancia al estrés así como mantener el ambiente reductor de las mismas.

Por lo que respecta a la defensa no enzimática, existen moléculas con la capacidad antioxidante. Estas sustancias reaccionan con radicales libres reactivos (ROS) de manera tal que inactivan (reducen) dichos radicales formando al mismo tiempo radicales libres pero de carácter débil y relativamente estable (no reactivo). Los radicales formados por antioxidantes pueden regenerarse por acción de otros antioxidantes como es el caso de la vitamina E. Algunos de compuestos antioxidantes se detallan a continuación:

Glutatión. Su capacidad antioxidante se debe al grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína, se encuentra presente tanto en plantas como animales, puede reaccionar con los radicales superóxido, hidroxilo así como con el oxígeno singulete y participa en general en el equilibrio redox de las células.

Ácido ascórbico. Es la molécula antioxidante más abundante en las plantas, se sintetiza en las mitocondrias, inactiva directamente las ROS y, como ya fue mencionado, puede actuar como sustrato de enzimas antioxidantes.

De importancia para este trabajo es destacar que entre las estrategias de defensa de las plantas se encuentra la producción de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos no proteicos y tocoferoles [89] que trabajan en conjunto para controlar la oxidación y proteger las células del daño oxidativo [90]. En el caso de los metabolitos secundarios de tipo fenólico, la plantas utilizan sus propiedades intrínsecas de evitar la formación de radicales libres (habilidad de deslocalizar electrones desapareados, quelar metales, reactividad con otros antioxidantes, etc.) disminuyendo el daño celular. Dichos metabolitos pueden acumularse en las células o ser liberados al medio a través de la exudación en las raíces.

I.2.6 Exudación de raíces

Las plantas continuamente secretan o excretan una gran variedad de compuestos a través de sus raíces (proceso conocido como exudación), dichos compuestos cumplen importantes papeles ya sea como atrayentes o repelentes químicos mediante los cuales las plantas pueden regular la actividad microbiana, enfrentar los herbívoros, crear simbiosis con otros organismos, cambiar las propiedades físicas y químicas del suelo, inhibir el crecimiento de plantas que compitan por los nutrientes y el espacio [91] así como llevar a cabo la absorción selectiva y almacenamiento de iones [92]. Esta exudación puede ser dividida en dos tipos de procesos, la primera involucra materiales de desechos y la segunda lubricación y defensa. Una clasificación de estos exudados está de acuerdo a la masa molecular de los compuestos; entre los de baja masa se pueden mencionar aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y pequeños compuestos fenólicos entre otros. Por lo que respecta a los de alta masa molecular, estos se refieren a sustancias tales como polisacáridos y proteínas [93]. La actividad de la planta para secretar compuestos por exudación utiliza entre del 5 al 21% del total del carbono fijado por la fotosíntesis [94]. Es importante señalar que la composición del exudado de las plantas puede ser modificada por la misma para hacer frente ante una situación de estrés [95-97] por lo que la identificación/cuantificación de los compuestos presentes en los exudados de las plantas proporciona información útil para mejor entendimiento de cómo las plantas actúan ante una situación de estrés abiótico. Cabe destacar que el estudio aquí realizado se enfocó en el estudio de compuestos fenólicos de bajas masas moleculares.

I.2.7 Compuestos fenólicos en plantas y su posible efecto sobre la metilación del DNA

En el metabolismo secundario de las plantas se sintetiza una gran variedad de compuestos que contienen en su estructura un anillo aromático con un grupo hidroxilo, estos compuestos son denominados como compuestos fenólicos. La estructura química de estos compuestos puede ser muy diversa, algunas de estas son relativamente sencillas como es el caso de los compuestos fenólicos de baja masa molecular tipo ácidos fenólicos, o bien pueden ser polímeros complejos como las ligninas o taninos. Los más abundantes son los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos provenientes de la ruta del ácido shikímico que es la vía principal de síntesis de compuestos aromáticos en plantas. Se estima que existen más de ocho mil diferentes tipos de compuestos fenólicos que se pueden dividir en diferentes clases de acuerdo a su estructura química [98]. De acuerdo a su esqueleto básico, los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo a la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura básica. Adaptado de Justin N. Kabera y *col.* [99].

Esqueleto	Descripción	Ejemplos
C6	Fenoles simples	Catecol, resorcinol
C6-C1	Ácidos Benzoicos y derivados	Ácidos gálico, protocatecuico, hidroxí y dihidroxibenzoicos, salicílico, vanílico, siríngico, 3,4-dimethoxybenzoico, benzoico.
C6-C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	Ácidos homogentísico, 3,4-dihidroxifenil acético, homovanílico,
C6-C3	Fenilpropanoides, cumarinas y derivados	Ácidos cafeico, p-cumárico, sinápico, ferúlico, <i>trans</i> 3-hidroxicinámico, <i>trans</i> 2-hidroxicinámico, cinámico, 4-metoxicinámico y cumarina.
C6-C3-C6	Flavonoides y derivados	Catequina, epicatequina
C6-C1-C6	Benzofenonas y estilbenos	Resveratrol, maclurina
C6-C2-C6	Xantonas	Euxantona
(C6-C3) _n	Lignanos, ligninas	Secoisolariciresinol, matairesinol

Dentro de la ruta metabólica del ácido shikímico se incorporan varias etapas, entre ellas se mencionan a continuación dos importantes:

1. La hidroxilación aromática en la cual se agregan grupos hidroxilo dando lugar a compuestos fenólicos con diferente grado de hidroxilación (de esta manera se forman ácidos tales como ácido 4-hidroxicinámico o ácido p-cumárico partir del cinámico).
2. Las O-metilaciones que metilan los grupos OH y son catalizadas por la S-adenosilmetionina (SAM) como cofactor donante de grupos metilos (dando lugar a ácidos fenólicos como el ferúlico y sinápico a partir de la metilación del ácido p-cumárico).

Etapas posteriores en la ruta metabólica de ácido shikímico llevan a la formación de monolignoles que a su vez dan origen a diferentes metabolitos como ligninas y lignanos que son constituyentes estructurales de la pared células vegetal. Es de relevancia para este trabajo mencionar que la SAM es utilizada por la maquinaria enzimática de las células para transferir grupos metilos no solo a metabolitos secundarios, sino también a sustratos tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo que implica una competencia entre las diferentes rutas metabólicas que requieran de este cofactor. Cabe mencionar, que si bien los modelos *in vitro* han contribuido enormemente al entendimiento del papel de los compuestos fenólicos en la regulación epigenética, aún no se han comprobado muchos de estos resultados en modelos *in vivo*, por lo que esta evidencia debe interpretarse y extrapolarse con mucha cautela entre ambos modelos [100].

La importancia de los compuestos fenólicos en plantas es debida a su actividad antioxidante y biológica. De esta manera, una de las funciones principales de estos compuestos es proteger a las plantas del estrés y de las especies reactivas de oxígeno. En el caso de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, ésta juega un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres.

Numerosas investigaciones científicas reportan una gran diversidad de compuestos fenólicos disponibles en las plantas, así como su relación con efectos fisiológicos positivos, así mismo, recomiendan profundizar en las investigaciones en diferentes productos naturales que contengan este tipo de compuestos a fin de definir concentraciones, biodisponibilidad y mecanismos de su acción benéfica [101].

Diferentes compuestos fenólicos extraídos de plantas han sido evaluados en función de la protección antioxidante que ejercen sobre el daño al DNA, en particular se estudió la protección contra peróxido de hidrogeno y de rayos ultravioleta encontrándose que los ácidos cafeico,

cinámico, ferúlico y *p*-hidroxibenzoico muestran una significativa actividad protectora contra el daño oxidativo [102]. De especial interés resulta el ácido clorogénico que se forma mediante la unión tipo éster del ácido shikímico y *p*-cumárico; la presencia de este compuesto está ligada a los mecanismos de defensa de la planta debido a su actividad depuradora de radicales libres. Uno de los enfoques de este trabajo es precisamente el estudio de compuestos fenólicos de baja masa molecular (C6-C1, C6-C2 y C6-C3) en material de plantas cultivadas en presencia de metales/metaloideos.

En particular, se evaluaron perfiles de compuestos fenólicos en biomasa y en exudados de *L. sativum* crecido en exposición a diferentes formas/concentraciones de selenio y su posible asociación con el grado de metilación global del DNA.

I.3 Espectrometría de masas como herramienta analítica utilizada en el presente proyecto

El aspecto más importante de la tesis ha sido el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos cuya aplicación en el análisis de materiales derivados de plantas proporcione información biológicamente relevante. En primera instancia, se utilizó la cromatografía de líquidos con detectores espectrofotométrico y fluorimétrico, pero el énfasis ha sido en el uso de cromatografía de líquidos en acoplamiento con espectrometría de masas. En el sistema utilizado, el eluyente de la columna cromatográfica fue introducido al espectrómetro mediante el dispositivo de electronebulización (ESI) como fuente de ionización y se utilizó el instrumento con trampa iónica como separador de masas. En particular, el modelo del instrumento fue AmaZon SL de Bruker y cromatógrafo de líquidos fue Dionex UltiMate 3000 de Thermo Scientific. Esta configuración se eligió porque los solutos de interés (compuestos fenólicos y nucleósidos) son compuestos no volátiles y relativamente polares lo que permite su separación en las columnas de fase inversa. Por otro lado, el espectrómetro con trampa iónica es un instrumento simple y robusto que es muy adecuado para el análisis de moléculas pequeñas para las cuales se cuenta con estándares auténticos y que pueden ser fragmentadas con el fin de mejorar las condiciones de cuantificación.

I.3.1 Analizador de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo de una amplia diversidad de moléculas, basada en la formación de iones, los cuales una vez obtenidos se separan de acuerdo a la relación masa/carga m/z de cada uno de ellos. Estos iones pueden ser además fragmentados antes de su introducción al separador de masas (o entre separadores de masas) lo que aumenta enormemente la selectividad del análisis. Las partes esenciales de un espectrómetro de masas son tres: (i) una fuente de iones, (ii) un separador de masas y (iii) un detector.

Fuente de iones

La fuente de iones es el dispositivo encargado de convertir los componentes de la muestra en los iones requeridos por el separador de masas. Existen diferentes tipos de fuentes de iones y su aplicación depende del tipo de muestra a ionizar. Un tipo de estas fuentes lleva a cabo la generación de iones a presión atmosférica y a ellas pertenece la ionización por electronebulización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI).

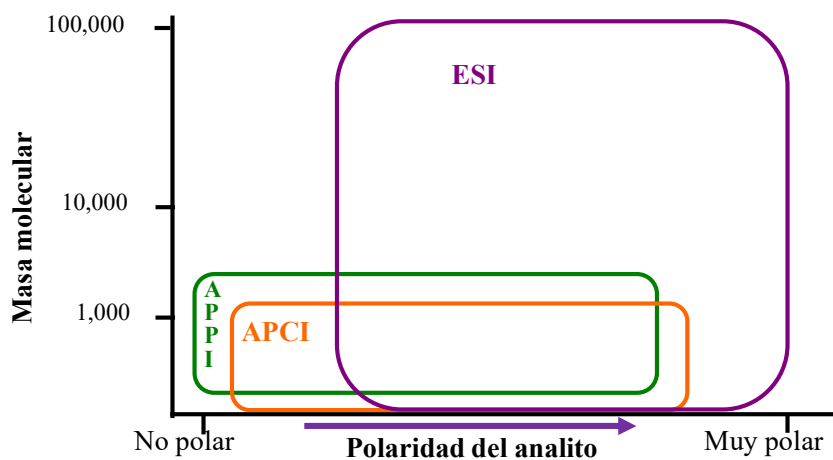


Figura 1.5 Esquema simplificado del rango cubierto por las técnicas de ionización a presión atmosférica. Adaptado de Bruker Daltonics.

El estudio realizado en esta tesis comprendió el análisis de 52 moléculas con las que se contó con estándares (34 compuestos fenólicos y 18 nucleósidos), más una gran cantidad de compuestos analizados provenientes de las diferentes matrices estudiadas; todas estas moléculas cubren un amplio rango de polaridades y van desde relativamente polares como es el caso de la cumarina hasta muy polares como la citidina. Para este tipo de analitos y de acuerdo a la Figura 1.5, la fuente

de ionización por electronebulización cubrió el rango de polaridad de mayor interés en este estudio, por lo que es la única que se describe a continuación.

ESI

El desarrollo de la ionización a presión atmosférica dio lugar a la obtención del premio Nobel de química en 2002 por John Fenn. Esta técnica es la forma de ionización más importante en el acoplamiento de cromatografía de líquidos con un analizador de masas y es de especial utilidad para la caracterización de moléculas polares. En la ionización por electronebulización, la muestra disuelta en una fase líquida (comúnmente el efluente de una columna cromatográfica) pasa a través de un capilar metálico al cual se le aplica un alto potencial a su salida (3-4 kV). El voltaje es aplicado a presión atmosférica y puede ser positivo o negativo dependiendo de los analitos de interés, comúnmente los analitos que ceden protones fácilmente pueden ser ionizados en ESI (-) y los que tienen aceptar protones en ESI (+). Cabe destacar que en el presente proyecto se utilizaron ambos tipos de ionización, ESI (-) para la mayoría de los compuestos fenólicos y positiva ESI(+) para todos nucleósidos. A la salida del capilar, se producen micro gotas cargadas (menores a 10 μm de diámetro); dado que las gotas presentan la misma carga, estas se repelen fuertemente por lo que se dispersan cubriendo un mayor volumen a la vez que disminuyen su tamaño debido a la evaporación del solvente; esta disminución de tamaño ocasiona que la distancia entre las moléculas dentro de las gotas disminuya dramáticamente llevando al punto donde la repulsión de las cargas vence la tensión superficial llevando al estallido de estas gotas (fenómeno conocido como *explosión de Coulomb*). Este proceso se repite llevando a la formación de los iones que son introducidos al separador (Figura 1.6).

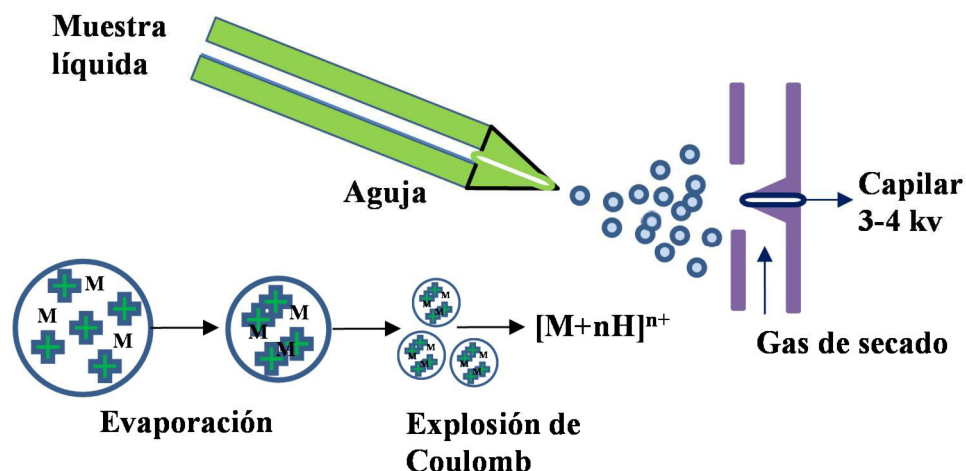


Figura 1.6 Esquema simplificado de la ionización por electronebulización en modo positivo.

Separadores de masas

Dentro del estado de arte de instrumentación en MS, se cuenta con diferentes tipos de separadores de masas; estos pueden ser clasificados de acuerdo con el principio de su funcionamiento como filtros y analizadores de masas. En el primer grupo se pueden mencionar cuadrupolo o trampa iónica, mientras que los equipos de sectores de campo (magnético y/o electrostático), tiempo de vuelo, resonancia ciclotrónica de iones (ICR) pertenecen al grupo de analizadores de masas. Por otro lado, los espectrómetros pueden ser agrupados como aquellos de alta y de baja resolución. La resolución se refiere a la capacidad de un separador para distinguir entre dos masas cercanas y se puede calcular mediante el cociente que resulta de dividir la m/z y la anchura del pico a la mitad de la altura. En este sentido los separadores de QTOF, trampa orbitante, FT-ICR o sectores del campo son de alta resolución llegando a los valores de resolución hasta 10^5 . Por otra parte un simple cuadrupolo o trampa iónica son de baja resolución y permiten distinguir iones que difieren prácticamente por unidad de masa atómica. Actualmente se cuenta con una amplia variedad de separadores de masa, cada uno con fortalezas y debilidades. Entre los más comunes están: Sector magnético, tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo (una variante de este es el triple cuadrupolo que permite hacer análisis de MRM), *Orbitrap* (trampa orbitante), resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR), trampa iónica entre otros. En particular, la trampa iónica a pesar de tener baja resolución, ofrece importantes ventajas; la más importante de ellas es la posibilidad de realizar varios ciclos de fragmentación de iones seleccionados de tal manera que se

puede obtener información estructural de los compuestos y llevar a cabo su cuantificación mediante MRM y EIC con una alta velocidad de barrido, lo que le permite realizar los ciclos MS/MS y MRM tanto en ESI(+) como en ESI(-) en la misma corrida cromatográfica. Aunado a esto, su costo es relativamente bajo comparado con otros analizadores que ofrecen análisis de tipo MS/MS y MRM. Estas fortalezas de la trampa de iones fueron utilizadas en este proyecto por lo que describe a continuación.

Trampa de iones (IT)

El principio de este separador se basa en el confinamiento de iones por un tiempo determinado mediante la acción de campo electromagnético formado/controlado por diferentes fuentes operados en la región de radiofrecuencia, para esto, la trampa de iones cuenta con un electrodo anular y dos electrodos en los extremos a manera de compuertas (Figura 1.7). Los iones introducidos en este espacio pierden energía al colisionar con helio y pueden ser confinados por un periodo de tiempo si cuentan con una m/z estable de acuerdo al campo electromagnético aplicado. Una vez confinados los iones, se pueden elegir dos opciones: (1) hacer un barrido de radiofrecuencia en el electrodo de salida lo que produce una inestabilidad selectiva de los iones confinados enviándolos al detector (multiplicador de electrones) el cual registra sus valores produciendo un espectro de masas, esta técnica se utilizó en este proyecto en el análisis de los compuestos fenólicos y (2) elegir iones de cierta relación m/z para ser colisionados con helio produciendo fragmentos (MS^2) característicos de cada molécula, este ciclo se puede repetir progresivamente con alguno de los fragmentos subsecuentes (MS^n). Este proceso da lugar a la espectrometría de masas en tándem y se detallará en la siguiente sección.

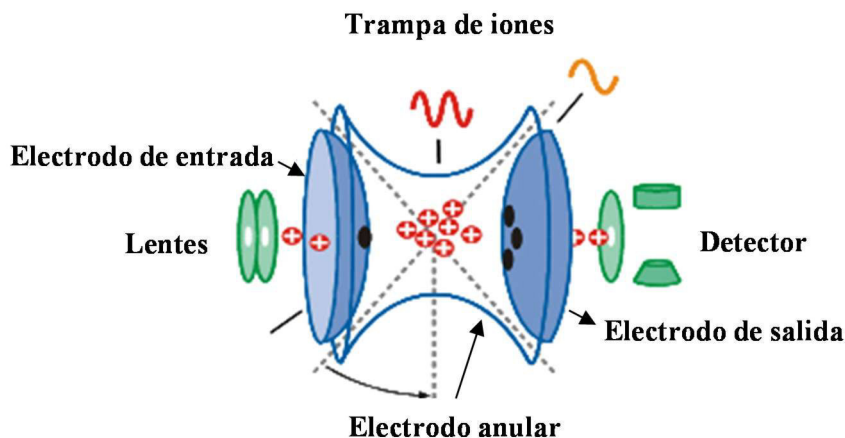


Figura 1.7 Esquema simplificado de una trampa de iones. Tomado de Bruker Daltonics.

I.3.2 Espectrometría de masas en tándem.

Las muestras biológicas son comúnmente complejas, la matriz de la muestra puede contener moléculas que enmascaran la detección del compuesto buscado, en estas condiciones, una buena alternativa es el análisis de masas en tándem. La espectrometría de masas en tándem ofrece información acerca de un ion específico (ion precursor), de esta manera y como se explicó en la sección anterior, los iones de interés son seleccionados y acumulados en base a la m/z como primera etapa. De aquí los iones precursores son fragmentados por algún método de disociación comúnmente mediante colisión con algún gas inerte y los fragmentos formados son analizados de acuerdo a sus m/z individuales (Figura 1.8). Los patrones de fragmentación obtenidos se pueden utilizar para comparar estructuras con bases de datos así como predicciones de moléculas mediante comparaciones *in silico*. Otra posibilidad de esta técnica es que permite el monitoreo de reacciones selectivas o múltiples (MRM), para esto los iones de interés se aíslan de los demás, posteriormente son excitados adquiriendo energía cinética que les permite colisionar con el gas de que los rodea. Esta colisión lleva a una fragmentación predecible y reproducible de cada ion pudiendo utilizar alguno de sus fragmentos (comúnmente el más abundante), con fines cualitativos y/o cuantitativos, esto representa un MRM para una transición, procedimiento que se utilizó para la cuantificación de nucleósidos en el presente proyecto (sección IV.4). Los iones formados en la primera transición pueden someterse a un nuevo ciclo de fragmentación con el fin de hacer MRM de dos transiciones, como es el caso del procedimiento utilizado para la cuantificación de homodímeros de citidinas (sección IV.4). Cabe mencionar que en el caso de las trampas iónicas estos ciclos se pueden repetir siempre y cuando haya suficiente abundancia de los iones productos generados, lo que conlleva a un compromiso entre la sensibilidad del procedimiento y su selectividad, en otras palabras, a mayor número de fragmentaciones se pierde sensibilidad (perdida inherente de masa debida a la fragmentación) pero se gana selectividad (con cada transición se reduce dramática mente la posibilidad de un falso positivo) y se elimina el ruido.

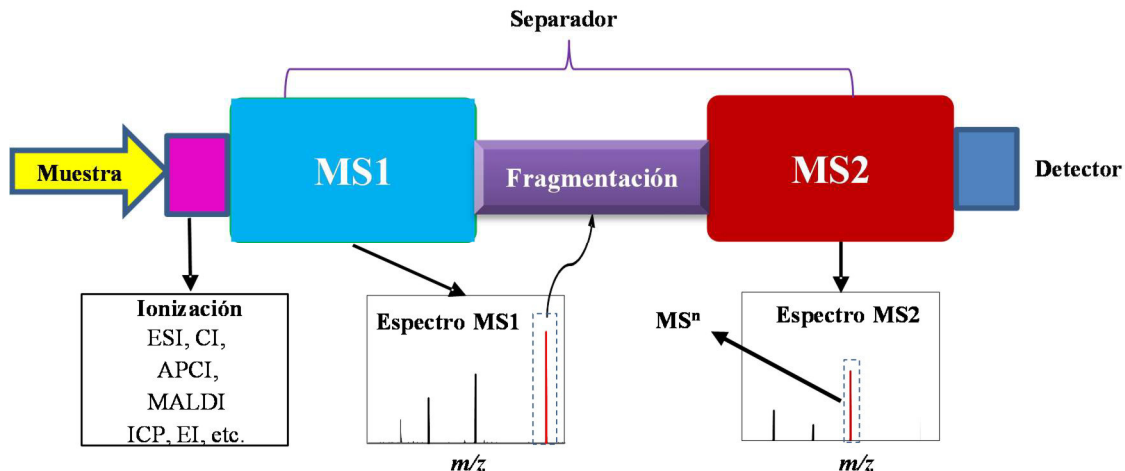


Figura 1.8 Diagrama simplificado de la espectrometría de masas en tándem. Los iones de la primera ronda (MS1) son selectivamente fragmentados y analizados en la siguiente ronda (MS2) para dar un espectro característico del ion seleccionado.

I.3.3 Cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS)

De acuerdo con su principio, en el que el barrido del espectro de masas está en función del valor m/z de los iones, la MS presenta muy alta selectividad hacia compuestos individuales. De esta manera, se podría pensar que la introducción directa (por infusión) de una muestra al MS debería permitir la detección y cuantificación de varios compuestos a partir de un solo espectro (con un adecuado tratamiento aplicado a los datos crudos). Sin embargo, la eficacia de ionización depende fuertemente de la composición de la solución introducida. La introducción de solamente el solvente en que se encuentre la muestra (un blanco cromatográfico), típicamente produce un ruido espectral en ESI(+) con una intensidad de 10^4 ; aunado a esto, la introducción directa a la trampa de iones no permite distinguir compuestos que presenten la misma masa nominal sea que provengan de la muestra o que resulten de la formación de aductos con iones comúnmente presentes (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , H_3O^+), estos aductos complican fuertemente el análisis por infusión ya que los analitos de interés aparecerán con otra masa nominal a la esperada en base a su fórmula molecular. Adicionalmente, se pueden presentar interacciones entre moléculas presentes al mismo tiempo en la cámara de electronebulización (como ejemplo la formación de puentes de hidrógeno entre nucleósidos llevaría a la formación no solo de homodímeros, sino también de heterodímeros como las pares de bases del DNA, dando lugar a un complejo equilibrio). Para evitar interferencias

en esta etapa así como aumentar la selectividad, la MS en muchas ocasiones se combina con la separación cromatográfica.

Durante los últimos tres lustros, la cromatografía de líquidos acoplada a detectores másicos ha evolucionado de ser una curiosidad científica a ser una técnica de rutina aplicada en muchos campos de la investigación. Esto ha sido posible en gran medida gracias a los avances en ionización a presión atmosférica. Por mucho tiempo, el acoplamiento entre un cromatógrafo de líquidos y un separador de masas fue muy difícil ya que el cromatógrafo trabaja con un flujo de fase líquida, mientras que el separador de masas trabaja en fase gas con alto vacío, sin embargo la ionización por electronebulización significó un enorme avance para resolver este problema.

La cromatografía de líquidos es el método de separación más común de muestras biológicas, esto debido a que la mayoría de los compuestos biológicos no son volátiles. Adicional a esto, la cromatografía de líquidos acoplada a los detectores de masas en línea, es una poderosa herramienta para el análisis de múltiples analitos que eluyan de la columna convirtiéndose en la primera opción de análisis de muestras biológicas complejas como es el análisis de productos extraídos de fuentes naturales, productos farmacéuticos, agroquímicos, ambientales, alimenticios así como en el área de la proteómica. LC-MS ofrece además selectividad y mayor información útil para confirmar la identidad de los compuestos en comparación con detectores unidimensionales como el de fluorescencia o UV. Otra de las razones del éxito de esta técnica deriva de la posibilidad de tener datos en tres dimensiones. Primero los compuestos son separados en tiempo durante la cromatografía, en seguida son separados de acuerdo a su relación m/z y finalmente el detector mide la abundancia de cada ion. La utilización de la cromatografía de líquidos acoplada con detector másico fue de enorme utilidad para alcanzar los objetivos planteados en este proyecto.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General

Avanzar en el conocimiento sobre las interacciones de algunos elementos metálicos y metaloides con ácidos nucleicos, mediante el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos.

II.1. Objetivo particulares

1. Adaptar el procedimiento HPLC-DAD para evaluar el efecto de estrés abiótico sobre la modificación del DNA: caso de pentaclorofenol.
2. Realizar un estudio analítico del impacto de diferentes formas de selenio sobre el perfil de compuestos fenólicos y metilación del DNA en la planta *L. sativum*.
3. Desarrollar un nuevo procedimiento analítico que permita la determinación de 34 compuestos fenólicos típicos de baja masa molecular, mediante el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con detector másico de trampa iónica para su aplicación en el análisis de materiales derivados de plantas.
4. Desarrollar nuevos procedimientos analíticos basados en cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de trampa iónica para la identificación/cuantificación de las modificaciones en ácidos nucleicos de las plantas expuestas a nanopartículas metálicas.
5. Realizar dos estancias de investigación sobre temas afines al metabolismo de los compuestos fenólicos en organismos vivos y al papel de biometales en los procesos epigenéticos.

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Equipo de Laboratorio

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de Agilent Technologies equipado con automuestreador, detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y fluorimétrico
- Cromatógrafo de líquidos modelo UltiMate 3000 de Dionex Thermo Scientific equipado con una bomba binaria, un compartimiento de columna con termostato y automuestreador.
- Trampa iónica modelo AmaZon SL de Bruker Daltonics equipada con una fuente de ionización por electronebulización
- Espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción (ICP-MS) modelo 7500ce de Agilent Technologies equipado con celda de colisiones/reacciones y automuestreador
- Cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin Elmer equipado con detector de ionización por flama
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Spectronic 3000 Milton Roy con detector de arreglo de diodos.
- Purificador de agua destilada Lab Tech LWD-3008
- Purificador de agua Milli-Q Labconco
- Liofilizador Labconco 2.5 plus
- Potenciómetro marca Corning
- Homogenizador IKA Ultra-Turrax T18
- Centrifuga HERMLE Labortechnik Z 326
- Speed Vac Vacufuge plus, Eppendorf

III.2. Estándares y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich a excepción de los que se indique otra procedencia y se describen en las condiciones experimentales de los capítulos IV y V.

III.3. Software

- ChemStation (Agilent Technologies)
- Chromeleon™ de Dionex
- Hystar V3.2
- Data Analysis V4.1 SP2 y *QuantAnalysis* V2.0 SP2 (Bruker Daltonics).
- Office 2010

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1 Estudio analítico de la modificación del DNA bajo estrés abiótico: caso de pentaclorofenol.

IV.1.1 Introducción

En la parte introductoria de la tesis se habló de los agentes causantes del estrés abiótico como potenciales desencadenadores de eventos epigenéticos. Sin duda, el evento epigenético más conocido y mejor caracterizado es la metilación/desmetilación del DNA; sin embargo, otro efecto posible del estrés abiótico es mediante la formación de aductos entre xenobióticos o sus metabolitos y los sitios específicos en el DNA. Para explorar la capacidad de herramientas analíticas para la detección/cuantificación de este tipo de aductos, la primera parte de trabajo se enfocó en el pesticida pentaclorofenol.

El pentaclorofenol, (2,3,4,5,6-pentaclorofenol, PCP) ha sido usado desde 1936, inicialmente como preservador de la madera contra insectos y hongos y posteriormente como un biocida universal, en la producción de cuerdas, pinturas, adhesivos, piel, aislantes y en paredes de ladrillo. Su uso excesivo e inadecuado llevó al problema de contaminación del agua y de los alimentos [103]. La activación metabólica del PCP puede llevar a la formación de aductos de DNA de manera tal que si estos aductos se forman en un gen crítico, pueden resultar en las mutaciones cancerígenas [1]. El metabolismo del PCP ha sido estudiado en humanos así como en animales, el cual ocurre principalmente en el hígado vía de cloración oxidativa o mediante oxidación vía un sistema de peroxidasas. Uno de los productos de degradación es la tetracloro-p-benzoquinona (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona, TCpBQ). Se ha demostrado la formación de aductos de TCpBQ con el DNA y se ha propuesto que dicha reacción podría considerarse uno de los mecanismos responsables por el carácter cancerígeno del PCP [104-107]. Cabe mencionar que en los trabajos que se acaban de citar, la caracterización estructural e identificación de los aductos se obtuvo mediante el uso de las técnicas de espectrometría de masas, RNM y marcaje con isótopos radioactivos. El intento de este estudio ha sido sintetizar el aducto de TCpBQ con desoxiguanosina y desarrollar un nuevo procedimiento cromatográfico para su determinación en hidrolizados del DNA, en presencia de desoxinucleósidos y nucleósidos.

IV.1.2 Objetivo

Desarrollar un nuevo procedimiento analítico para la determinación del aducto del principal metabolito de pentaclorofenol (TCpBQ) y DNA, basado en la hidrólisis del DNA y la separación cromatográfica en fase inversa con detección espectrofotométrica.

IV.1.3 Condiciones Experimentales

Separación cromatográfica de dG, Cl₄BQ y dG-Cl₂BQ en la mezcla de reacción: HPLC 1200 Agilent; columna Luna C8 (250 mm x 3.0 mm, 5µm) marca Phenomenex; volumen de inyección 5-100 µL; flujo 0.5 mL min⁻¹, temperatura 35 °C; elución en gradiente de modificador orgánico, utilizando tres fases móviles: tampón fosfatos/acetatos 20 mM, pH 7.4, metanol y acetonitrilo.

Separación cromatográfica de citidina (C), 2'-desoxicitidina (dC), uridina (U), 5-metil-2'-citidina (5mC), guanosina (G), desoxiguanosina (dG), timidina (T), adenosina (A), 2'-desoxiadenina (dA) y dG-Cl₂BQ: columna Luna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5µm) marca Phenomenex; volumen de inyección 20 µL; flujo 1.0 mL min⁻¹, temperatura 40 °C; elución en gradiente de modificador orgánico, utilizando tres fases móviles: tampón fosfatos/acetatos 20 mM, pH 7.4, metanol y acetonitrilo.

IV.1.4 Resultados y discusión

La síntesis del aducto se llevó a cabo en viales de vidrio con tapa de teflón, se estudiaron diferentes condiciones experimentales, obteniéndose el mejor rendimiento utilizando la mezcla de 50 µL de dG (1 mg mL⁻¹ ~3.7 mM disuelta en agua) y de 100 µL de TCpBQ (1.4 mg mL⁻¹ ~5.64 mM, disuelta en DMSO) que corresponde al exceso de TCpBQ en una relación molar de ~3:1, a la mezcla anterior se agregaron 600 µL de DMSO y 250 µL de tampón de fosfatos 100 mM, pH 7.4 (Figura 4.1).

Se recolectó la fracción de columna en la que se eluyó el aducto y en la Figura 4.2 se presenta el cromatograma del compuesto purificado junto con su espectro de absorción.

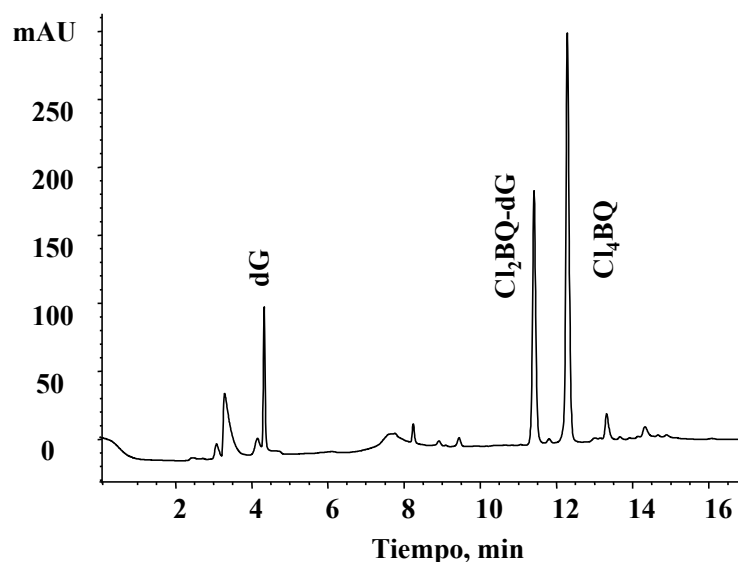


Figura 4.1 Cromatograma de la reacción entre TCpBQ (12.29 min) y desoxiguanosina (4.35 min), obteniéndose la formación del aducto Cl₂BQ-dG (11.41 min). Detección en DAD a 260 nm.

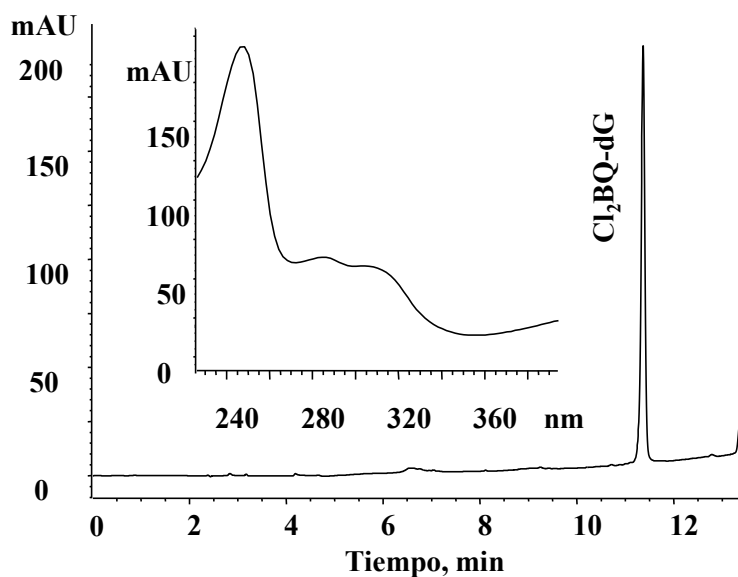


Figura 4.2 Cromatograma típico HPLC-DAD de la fracción correspondiente al aducto dG-Cl₂BQ (Figura 4.1), con su correspondiente espectro de absorción. Detección en DAD a 260 nm.

Una vez obtenido el compuesto de interés se intentó lograr un buen rendimiento de la síntesis. Para ello, se varió el pH del medio en el intervalo de pH 4.5 – 7.8 y el más alto rendimiento (65%) se obtuvo a pH 7.4. Otros parámetros examinados fueron el porcentaje de DMSO en la mezcla de reacción y el tiempo de la misma. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.3,

observándose que el medio con 70% de DMSO (v/v) es el más adecuado y que no hay diferencia significativa entre 2 h o 4 h de reacción, especialmente con 70% de DMSO.

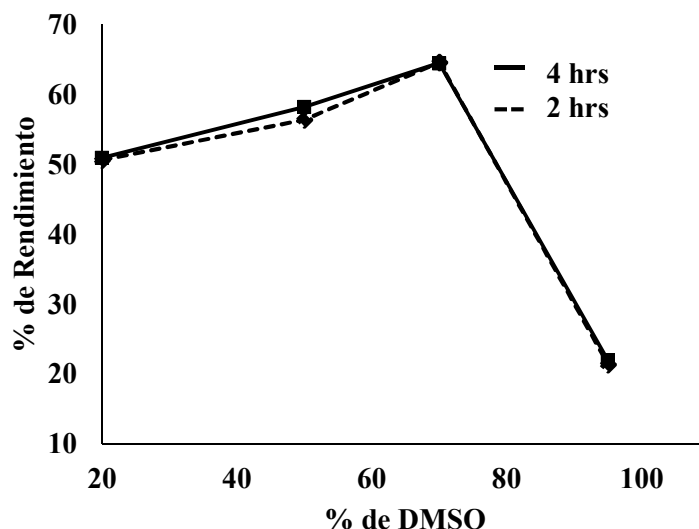


Figura 4.3 Efecto del porcentaje del DMSO (v/v) en el medio de la reacción sobre el rendimiento de la síntesis del aducto Cl₂BQ-dG a 68°C.

Finalmente, se realizaron las pruebas utilizando como medio de reacción el 30% de agua y 70% (v/v) de los siguientes disolventes orgánicos: dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (MeCN) y dimetilsulfóxido (DMSO) con tiempo de reacción 2 h y temperatura 68 °C. Los porcentajes de conversión se presentan en la Tabla 4.1; como se puede observar el DMSO es un disolvente más adecuado para llevar a cabo la síntesis.

Para poner a punto las condiciones de separación cromatográfica del compuesto sintetizado, así como de desoxinucleósidos y nucleósidos potencialmente presentes en hidrolizados del DNA, se modificó el procedimiento desarrollado anteriormente [108]. Las condiciones finales se describen en la parte experimental y en la Figura 4.4 se presenta el cromatograma de una mezcla de estándares (2mg L⁻¹), donde se obtuvo la resolución hasta línea base de los diez compuestos en un tiempo total de 18 min. Cabe mencionar que este procedimiento podría ser utilizado para la determinación del aducto y para la evaluación del grado de metilación del DNA y del RNA en una sola corrida de la muestra.

Tabla 4.1 Efecto del solvente en el rendimiento de formación del aducto dG-Cl₂BQ.

Solvente	pH	% de Rendimiento
DMF	7.4	5.90
MeCN	7.4	48.2
DMSO	4.5	3.80
DMSO	7.4	64.6

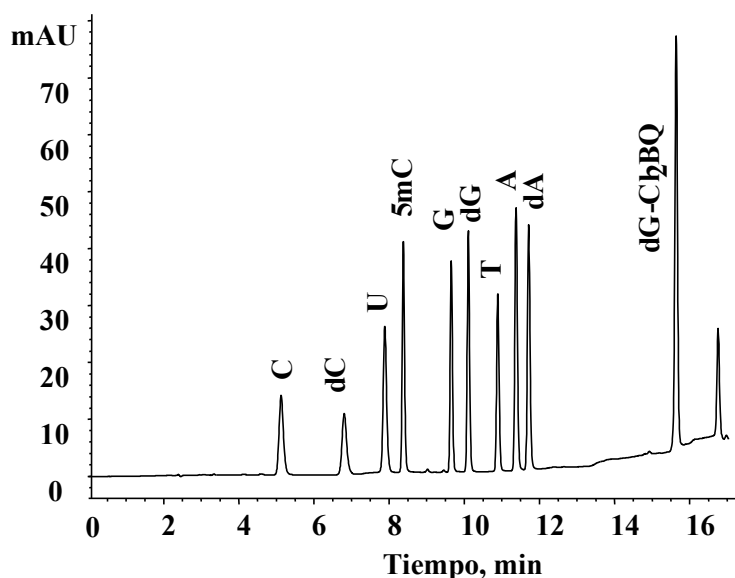


Figura 4.4 Típico cromatograma obtenido para la separación del aducto dG-Cl₂BQ y estándares (2mg L⁻¹) de desoxinucleósidos, nucleósidos y 5-metilcitiidina, detección en DAD a 260 nm.

IV.1.5 Conclusiones

Se obtuvo el aducto dG-Cl₂BQ con el rendimiento de 65%, utilizando 70% (v/v) DMSO como solvente, pH 7.4, temperatura 68 °C y 2 h de reacción. Asimismo, se logró la separación cromatográfica de dicho aducto y de nueve desoxi- y ribonucleósidos. En este corto ejercicio, se ha demostrado el potencial de HPLC-DAD en el estudio de las modificaciones del DNA por la acción de los agentes de estrés abiótico. La principal limitación de este sistema es que puede ser utilizado exclusivamente para la detección/cuantificación de las modificaciones conocidas, para

las cuales existen estándares comerciales o estos son posibles de sintetizar/purificar en el laboratorio. Es por ello que en esta tesis se optó por utilizar espectrometría de masas que es la herramienta más adecuada cuando se pretende caracterizar modificaciones de ácidos nucleicos desconocidas o no esperadas.

IV.2 Estudio comparativo de nanopartículas de selenio elemental y del ion selenito en la planta *Lepidium sativum* con enfoque en los compuestos fenólicos y en la metilación global del DNA

IV.2.1 Introducción

En el mundo de las plantas, el selenio no es considerado un elemento esencial, sin embargo hay numerosas evidencias de su papel benéfico en términos de promover el crecimiento, actuar como antagonista de metales pesados y, de manera más general, como protector de plantas contra agentes del estrés abiótico [109]. Por otro lado ya se mencionó en la parte introductoria que en plantas no-acumuladoras el efecto benéfico se observa solamente en cierto intervalo de bajas concentraciones de Se. La captación de Se dependiendo de su forma disponible en el suelo o en el medio de cultivo, su distribución, acumulación y especiación en plantas han sido estudiados extensivamente [110, 111]. Cabe mencionar que la metabolización de Se en organismos vivos requiere su reducción a Se^{-2} para la incorporación del elemento a los compuestos orgánicos. En cuanto a las fuentes de selenio para las plantas, las formas inorgánicas son más comunes en el medio ambiente respecto a las formas orgánicas (principalmente aminoácidos como Se-metionina). Entre los dos estados de oxidación en compuestos inorgánicos, Se(IV) es menos biodisponible para las plantas pero se transforma en formas orgánicas de manera más eficiente y con menor daño oxidativo en comparación con Se(VI). Se ha reportado que en *L.sativum* los efectos del selenio dependen de su forma fisicoquímica y su concentración en el medio de crecimiento [112, 113], cabe señalar que en la mayoría de los trabajos publicados se utilizó selenio en forma de ión selenito (Se(IV)). Bajo la exposición a Se(IV) en concentraciones iguales o menores a 0.5 mgSe L^{-1} , el crecimiento de la planta y su capacidad antioxidante se vieron favorecidos; sin embargo para más altas concentraciones de Se(IV) se produjeron efectos adversos en términos de la inhibición del crecimiento, disminución de los niveles de los micronutrientes minerales (Zn, Mn y Cu) y el incremento del estrés oxidativo - evaluado con base en cambios del grado de insaturación de ácidos grasos poliinsaturados y cambios de la concentración de malondialdehído [112]. Se tienen evidencias que bajo la exposición a Se(IV), ocurre cambio de la metilación global del DNA y RNA [51]. Por su parte, en los cultivos de *L. sativum* bajo exposición simultánea de Cd(II) y Se(IV), se demostró el rol protector del selenio contra la toxicidad del cadmio y se sugirió que esta acción

protectiva se lleva a cabo al exterior de la planta y ocurre mediante reducción de iones estresantes formando puntos cuánticos CdSe [114]. Cabe mencionar que la reducción de selenio inorgánico y la formación de nanopartículas de selenio elemental, ha sido reportada en cultivos de diferentes plantas y microorganismos y adjudicada a la actividad metabólica de estos organismos [115-120]. Por otro lado, el impacto de nanopartículas de selenio en plantas ha sido poco estudiado [121, 122]. En concreto, no se conocen los efectos de estas nanopartículas en la maquinaria antioxidante de la planta y tampoco se ha encontrado información sobre NPSe como un posible factor epigenético.

En el contexto de este trabajo, resultó interesante evaluar de manera comparativa los efectos de Se(IV) y NPSe en *L. sativum* con enfoque a los compuestos fenólicos que presentan propiedades reductoras y que se generan como metabolitos secundarios en las plantas. Ya fue mencionado que los no-deseados eventos epigenéticos tales como metilación/desmetilación y otras modificaciones de los ácidos nucleicos pueden ser provocados por agentes estresantes abióticos mediante su acción pro-oxidante, mientras que la formación de compuestos fenólicos es un elemento importante de la maquinaria defensiva de la planta contra el estrés oxidativo. De ahí, en la presente sección se describen los resultados obtenidos en la evaluación de compuestos fenólicos en exudados y en fracciones de biomasa de berros crecidos en presencia de diferentes concentraciones de selenio en forma de Se(IV) y de NPSe. Debido a que las nanopartículas tuvieron un impacto mucho menos pronunciado respecto a Se(IV), el trabajo se centró en Se(IV), evaluando la asociación entre las condiciones de exposición (concentración de Se(IV) en el medio) y las concentraciones de compuestos fenólicos mediante el análisis estadístico multivariante (método de componentes principales, PCA). Finalmente, se determinó el porcentaje de metilación global del DNA en plantas expuestas, buscando posible relación entre este parámetro y los cambios de perfiles de compuestos fenólicos en exudados y en fracciones de biomasa.

IV.2.2 Objetivo

Realizar un estudio analítico que permita caracterizar de manera comparativa los efectos de nanopartículas de Se y de Se(IV) en la planta *L. sativum* con enfoque en los compuestos fenólicos y metilación del DNA.

IV.2.3 Condiciones Experimentales

Los reactivos utilizados fueron grado analítico (Sigma-Aldrich). Los solventes grado HPLC y agua desionizada (18.2 MX cm, Labconco, USA).

Los siguientes compuestos fenólicos de Sigma fueron utilizados: resorcinol, cafeína, catequina, epicatequina, pirocatecol, cumarina y los siguiente ácidos: Ascórbico, gálico, homogentísico, protocatecuico, 3,4 dihidroxifenilacético, clorogénico, 2,5-dihidroxibenzoico, p-4-hidroxibenzoico, cafeico, vanílico, siríngico, 2,3-dihidroxibenzoico, homovanílico, 2,4-dihidroxibenzoico, 3-hidroxibenzoico, 3,4-Dihidroxifenilpropiónico, 2,6-dihidroxibenzoico, p-cumárico, sinápico, ferúlico, 3,4-dimetoxibenzoico, t-3-hidroxicinámico, 2-hidroxicinamico, salicílico, benzoico, cinámico y o-anísico (2-metoxibenzoico) como estándar interno.

Síntesis de NPSe

Para la síntesis de las NPSe se siguió un método publicado por Zhang y col. [123]. En resumen, se mezclaron 10 mL de H_2SeO_3 con 10 mL 0.125 mM de ácido ascórbico en presencia de 50 mg de goma arábica y se permitió que la reducción se llevara a cabo por 60 minutos a 0 °C en agitación constante. Para la separación de las NPSe, la mezcla de reacción se sometió a diálisis utilizando una membrana de celulosa de 12 kDa en solución Hoagland por 96 horas y haciendo cambio de solución cada 24 horas.

Caracterización de las NPSe

El tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas se determinó por dispersión de luz dinámica (DSL) teniendo un diámetro promedio de 126 nm, (Figura 4.5). Estas nanopartículas confieren a la solución el color naranja-rojizo. Su espectro de absorción UV-VIS registrado después de la diálisis se muestra en la Figura 4.6.

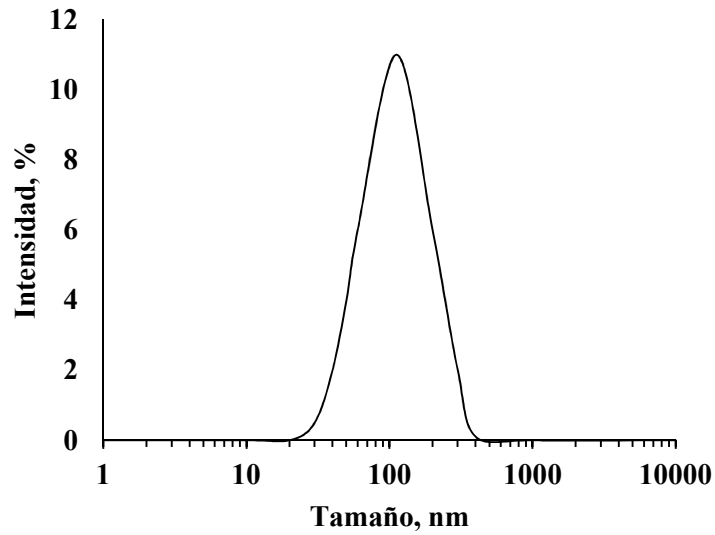


Figura 4.5 Distribución del tamaño de las NPSe, análisis realizado mediante dispersión de luz dinámica (DSL), el tamaño promedio observado para las NPSe fue de 126 nm.

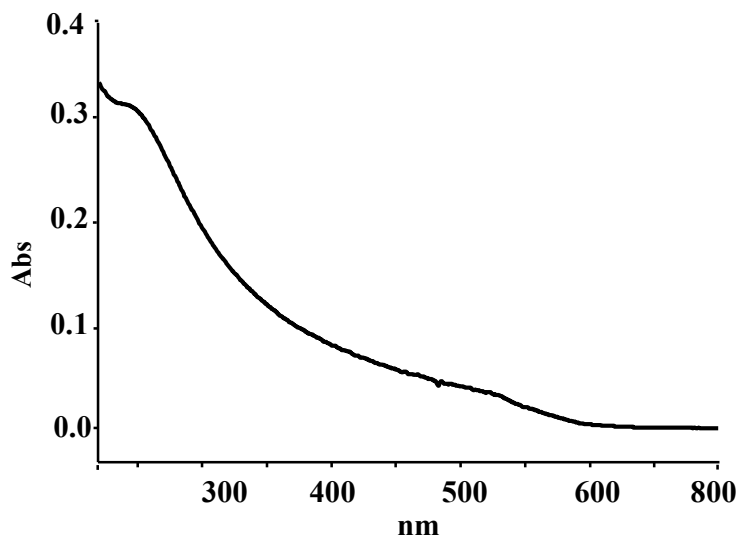


Figura 4.6 Espectro de absorción UV-VIS registrado en la solución después de diálisis, conteniendo NPSe.

Crecimiento de L. sativum

El crecimiento hidropónico de las plantas se realizó en solución de Hoagland [124] que contenía: nitrato de calcio 0.35 mM, cloruro de calcio 2.1 mM, sulfato de magnesio 0.91 mM, fosfato monosódico 0.97 mM, nitrato de potasio 1.22 mM, ácido bórico 23 μM , cloruro de manganeso 3.9 μM , trióxido de molibdeno 0.5 μM , nitrato férrico 10 μM , nitrato de zinc 0.6 μM , y sulfato de cobre 0.5 μM ajustado a pH 5.8. Después del periodo de germinación de 7 días, las plantas fueron expuestas a diferentes condiciones de Se(IV) y NPSe. Como fuente de Se(IV) se utilizó selenito de sodio; y se utilizaron las NPSe anteriormente descritas. Las concentraciones utilizadas para ambas formas de selenio fueron: 0.5, 2.0, 10, 50 y 100 mg de Se L^{-1} , además de un cultivo control. Para cada condición de exposición se utilizaron aproximadamente 250 semillas. Después de siete días de exposición las plantas fueron lavadas con cloruro de calcio 0.05 M y agua desionizada. El medio de cultivo se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización.

Análisis de compuestos fenólicos en biomasa por GC-FID

Para la extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo la siguiente metodología: 100 mg de berros frescos tanto de la parte aérea como de la raíz, se suspendieron en 1 mL de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ 10:3:1 y se homogenizaron con el uso de un polytron; se evaporó el solvente y la pastilla se resuspendió en 500 μL de la misma mezcla de solventes; se tomaron 100 μL se evaporaron y se reconstruyeron nuevamente en 100 μL de piridina para la derivatización con 50 μL de MSTFA por 30 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las condiciones de separación cromatográfica se presentan en la Tabla 4.2.

Análisis de compuestos fenólicos en el medio de cultivo por HPLC-DAD/FLD

Las muestras y las soluciones de calibración fueron filtradas (filtros Whatman 0.22- μm) y se inyectaron 20 μL en el sistema cromatográfico de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 4.3. Se preparó una serie de curvas de calibración que contenían 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 y 5 mg L^{-1} , de las cuales se obtuvieron sus funciones lineales de calibración para futuras cuantificaciones.

Tabla 4.2 Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos derivados con MSFTA por GC-FID

Columna	DB-5, 30 m, diámetro interno 0.25 mm, grosor de película 0.25 μm		
Fase móvil	Hidrógeno, 0.8 mL min ⁻¹		
Inyección	Split 1:10	Volumen 1 μL	
Temperatura del detector	320 °C		
Temperatura del inyector	240 °C		
Gases del detector	H ₂ 45 mL min ⁻¹ ; aire 450 mL min ⁻¹		
Programa de temperatura en el horno	°C min⁻¹	Temperatura, °C	Sostenido, min
	-	70	1
	10	300	0
	20	320	10

Exudado de raíz

Después de haber cosechado los berros, se tomaron 7 mL de cada medio, se agregaron 100 ng de estándar interno (ácido *o*-anísico), se acidificaron con HCl hasta obtener un pH 2 y se extrajeron los posibles compuestos fenólicos presentes en el medio con tres porciones de 1 mL de ciclohexano:acetato de etilo 1:1, se evaporó el solvente y la pastilla se resuspendió en 200 μL de fase móvil inicial, se centrifugó a 13,000g y se utilizó para su análisis por HPLC. Las condiciones de separación cromatográfica se presentan en la Tabla 4.3.

Compuestos fenólicos libres (F1), unidos a glicósidos (F2) y unidos a pared (F3)

Para cada uno de los cultivos expuestos a Se(IV), se pesaron aproximadamente 40 mg de raíz y 100 mg de parte aérea de biomasa fresca, de los cuales se obtuvieron tres extractos F1, F2 y F3 tal como se presenta en el esquema en la Figura 4.7 [113, 125]. Cada uno de los residuos obtenidos en el proceso de fraccionamiento (F1, F2 y F3) se disolvió en 200 μL de fase móvil inicial y 20 μL fueron introducidos al sistema cromatográfico bajo las condiciones descritas en la Tabla 4.3. Con las condiciones cromatográficas seleccionadas, se inyectaron por separado cada uno de los

estándares y se obtuvieron sus funciones de calibración mostrados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.3. Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos en medio de cultivo por HPLC-DAD/FLD.

Columna	Luna C18 (C2) (250 x 4.6 mm, 5 μ m) de Phenomenex
Fases móviles.	B - acetonitrilo, C – MeOH, D- fosfato de amonio 30 mM pH 2.5
Programa de gradiente	0 -2 min 10% B, 10 %C, 10%D 2-15 min 30% B, 30% C, 10%D 15-18 min 40% B, 40% C, 10%D 18-18.5 min 10% B 10% C, 10%D
Temperatura	40 °C
Flujo.	1.0 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	20 μ L
Detección	FLD λ_{Ex} =305 nm, λ_{Em} =365 nm, 407 nm, 436 nm DAD: 280 nm, 254 nm, 310 nm

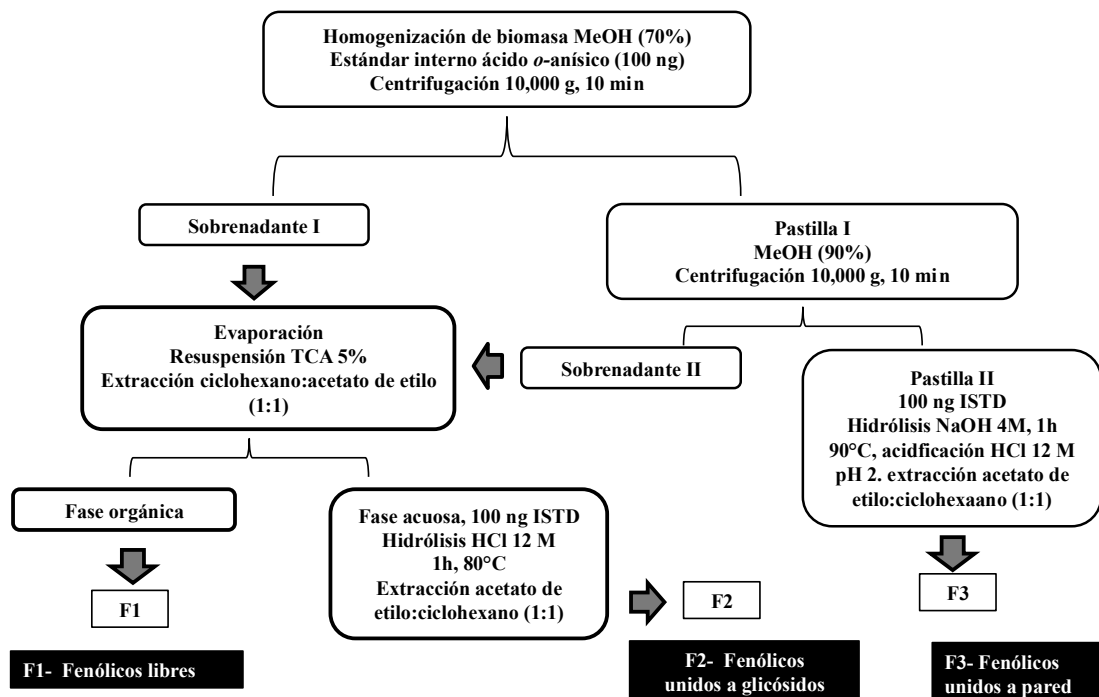


Figura 4.7 Esquema del fraccionamiento de los compuestos fenólicos en la biomasa: F1 – compuestos fenólicos libres, F2 – solubles, unidos a glicósidos y F3 – insolubles, unidos a la pared.

*Análisis de la metilación global del DNA extraído de *L Sativum**

Para la extracción del DNA de la biomasa se utilizó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi, y se describe a continuación:

1. ~100 mg tejido + 400 μ l buffer extracción (100 mM tris-HCl, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl pH=8)
2. Homogenizar en polytron y reposar 5 minutos
3. 50 μ l SDS 20%, 65°C 1 hora, vortex
4. Agregar 500 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1, vortex, 10 min reposo
5. Centrifugar 15 min a 13,000 g 4°C, tomar fase acuosa (superior) y agregar 1V de isopropanol, vortex, 1hr a -20°C
6. Lavar con etanol al 70% y secar (2X, secado sin speed back)
7. Resuspender en agua

Tabla 4.4. Funciones lineales de calibración de los compuestos analizados utilizando el procedimiento HPLC-DAD/FLD.

Compuesto	t retención (min)	Función de regresión lineal ^a	R	Condiciones de detección
Ácido gálico	3.48	$A = 108.3c + 0.243$	0.9999	254 nm
A. homogentísico	4.19	$A = 66.67c + 0.099$	0.9999	293 nm
A. protocatecuico	5.26	$A = 32.31c + 0.914$	0.9999	254 nm
A. 3,4-dihidroxi- fenilacético	5.63	$A = 15.47c + 0.230$	1	280 nm
Catequina	5.98	$A = 196.4c + 0.187$	0.9998	280 nm
A. clorogénico	6.15	$A = 19.93c + 0.027$	1	327 nm
Resorcinol	6.35	$A = 28.44c - 0.142$	0.9997	275 nm
Cafeína	7.24	$A = 46.23c + 0.480$	1	273 nm
A. 2,5-dihidroxi- benzoico	7.42	$A = 596.6c + 70.46$	0.9991	Ex=305, Em= 436
Epicatequina	7.81	$A = 67.87c + 0.076$	0.9995	280 nm
A. p-hidroxi- benzoico	7.84	$A = 35.86c + 0.413$	1	254 nm
Pirocatecol	8.25	$A = 396.1c + 0.242$	1	280 nm
A. cafeico	8.32	$A = 119.6c + 15.59$	0.9989	325 nm
A. vanílico	8.59	$A = 73.10c + 0.007$	0.9997	254 nm
A. sirínico	8.72	$A = 45.66c + 0.997$.9999	275 nm
A. 2,3-dihidroxi- benzoico	8.77	$A = 19.49c + 0.132$	0.9991	313 nm
A. homovanílico	8.85	$A = 17.32c + 0.077$	0.9995	280 nm
A. 2,4-dihidroxi- benzoico	8.85	$A = 18.92c + 0.253$	0.9993	295 nm
A. 3-hidroxi- benzoico	9.29	$A = 21.18c + 0.064$	0.9991	297 nm
A. 3,4-Dihidroxi- fenilpropio- nico	10.19	$A = 17.41c + 0.013$	0.9995	280 nm
A. 2,6-dihidroxi- benzoico	10.57	$A = 17.39c + 0.032$	0.9992	308 nm
A. p-cumárico	10.70	$A = 85.21c - 8.775$	0.9993	311 nm
A. sinápico	11.26	$A = 22.42c - 0.620$	0.9999	325 nm
A. ferúlico	11.36	$183.6c + 3.188$	0.9998	323 nm
A. 3,4-dimetoxi- benzoico	12.05	$A = 498.7c + 47.52$	0.9998	Ex=305, Em= 365
A. t-3-hidroxi- cinámico (m- cumárico)	12.12	$A = 238.3c + 0.045$	0.9996	280 nm
A. t-2-hidroxi- cinámico	13.51	$A = 175.4c + 0.079$	0.9992	280 nm
A. salicílico	13.80	$A = 689.3c + 78.26$	1	Ex=305, Em=407
A. benzoico	13.82	$A = 7.380c + 0.065$	1	280 nm
Cumarina	14.33	$A = 155.9c + 0.021$	0.9997	280 nm
A. cinámico	16.86	$A = 153.7c + 4.217$	0.9999	280 nm

a- A-Área de pico, c- mg L⁻¹

Digestión de DNA para obtener nucleósidos

Para la digestión de DNA se utilizó el método descrito en el artículo de Rozhon y col., 2008. Se colocó en un microtubo de 1.5 mL de 1 a 10 μg de DNA disueltos en 42 μL de agua, se mezcló con 5 μL de amortiguador de digestión. A la mezcla anterior se le adicionó 2 μL de DNAsa I 10 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ y 1 μL de nucleasa P1 1.25 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$. La mezcla anterior se incubó en un baño de agua a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. Después las muestras fueron congeladas y más tarde se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. A cada muestra se le adicionó 5 μL de hidróxido de sodio 100 mM y 2 μL de fosfatasa alcalina 1 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$. La mezcla anterior se incubó durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en baño de agua, y se le adicionaron 150 μL de fase Móvil (40 mM fosfato de amonio, 13 mM acetato de amonio y 1 mM EDTA, pH= 4.1)

Análisis por HPLC-DAD

Separación cromatográfica de citidina (C), 2'-desoxicitidina (dC), uridina (U), 5-metil-2'-citidina (5mC), 5-metil-2'-desocitidina (5mdC), guanosina (G), desoxiguanosina (dG), timidina (T), adenosina (A), 2'-desoxiadenina(dA): columna Luna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) marca Phenomenex; volumen de inyección 50 μL ; flujo 1.0 mL min^{-1} , temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$; elución en gradiente de modificador orgánico, utilizando tres fases móviles: Agua, tampón fosfatos:acetatos:EDTA 40:10:1 mM, pH 4.1 y metanol.

El porcentaje de metilación se determinó en base a la relación de concentraciones molares $5\text{mdC}/(5\text{mdC} + 5\text{mC})$ para el DNA, las concentraciones se determinaron basándose en la altura del pico con detección por DAD a 282 nm.

IV.2.4 Resultados y discusión

Se utilizaron nanopartículas de Se elemental obtenidas en el laboratorio y cuyo diámetro promedio resultó de aprox. 126 nm. A los 7 días de exposición de los berros a NPSe se observó una ligera inhibición del crecimiento de las plantas tratadas con 50 mg L^{-1} y 100 mg L^{-1} respecto al control, con un decremento del contenido de clorofila detectado solamente en las plantas expuestas a 100 mg L^{-1} Se (16.3 \pm 0.4 SPAD para 100 mg L^{-1} Se vs 19.2 \pm 0.5 SPAD en control); asimismo, para

las concentraciones menores de 50 mg L⁻¹ de NPSe visualmente no se detectó ningún síntoma de intoxicación con respecto al control (Figura 4.8).

Al mismo tiempo, en los berros expuestos a Se(IV) ocurrió deterioro fisiológico mucho más marcado en las plantas expuestas a 50 y 100 mg L⁻¹ respecto las mismas concentraciones de NPSe (Figura 4.9).

Al comparar el crecimiento de berros en presencia de Se(IV) y NPSe por encima de 10 mg L⁻¹ de Se en el medio (Figura 4.10), resultó evidente que las nanopartículas tuvieron un efecto menos notorio, probablemente debido a su tamaño relativamente grande y por ello baja biodisponibilidad. Cabe mencionar que en el caso de las plantas expuestas a 35, 50 y 100 mg L⁻¹ Se(IV), se observó una coloración roja del medio, lo que indica la reducción del selenito a selenio elemental. Este efecto no fue observado en las soluciones de medios de cultivo sin la planta, por lo que el proceso de reducción es facilitado por la actividad metabólica de los berros, en concordancia con los resultados reportados anteriormente para otros tipos de organismos [115-120].

A partir de estos resultados, el trabajo se enfocó en la evaluación comparativa de los perfiles de compuestos fenólicos en plantas expuestas a NPSe y Se(IV) utilizando la cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID).

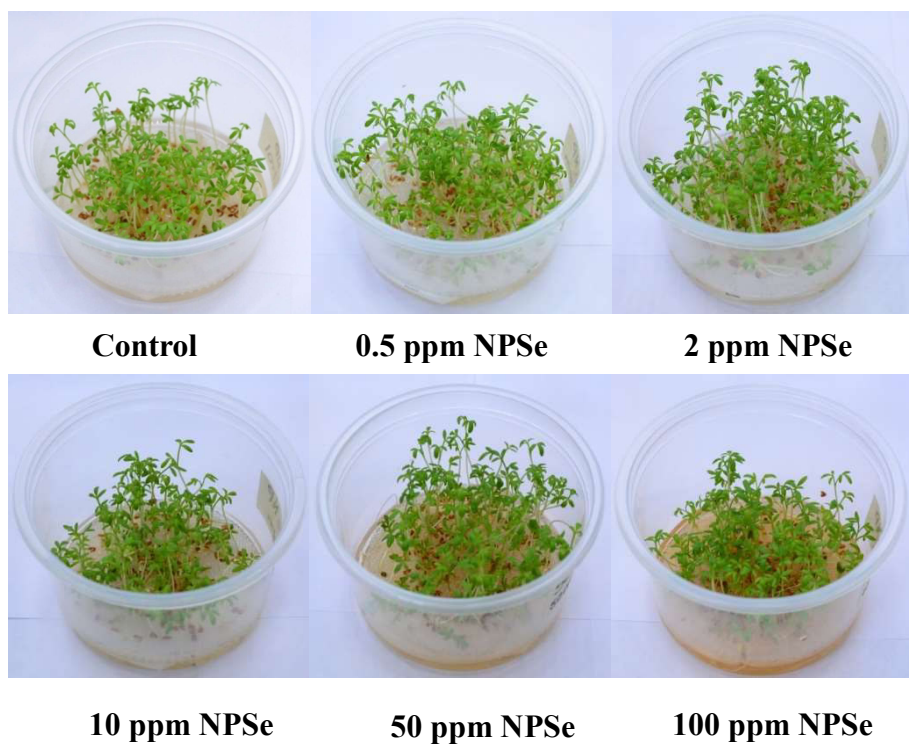


Figura 4.8 *L. sativum* expuesto 7 días a diferentes concentraciones de NPSe.

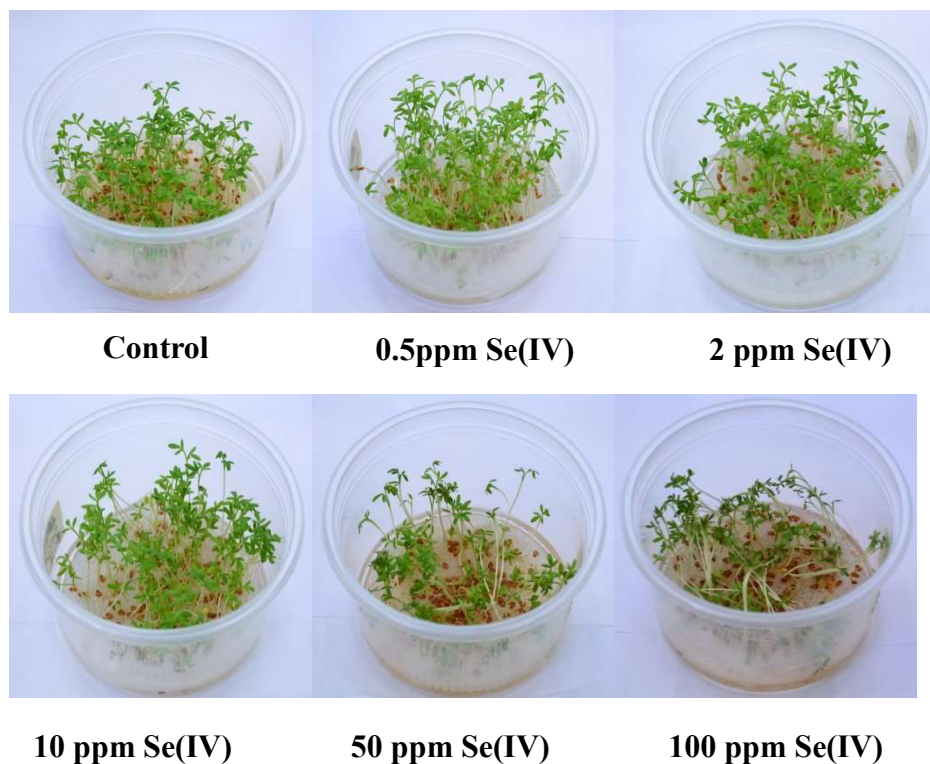


Figura 4.9 *L. sativum* expuesto 7 días a diferentes concentraciones de Se(IV).

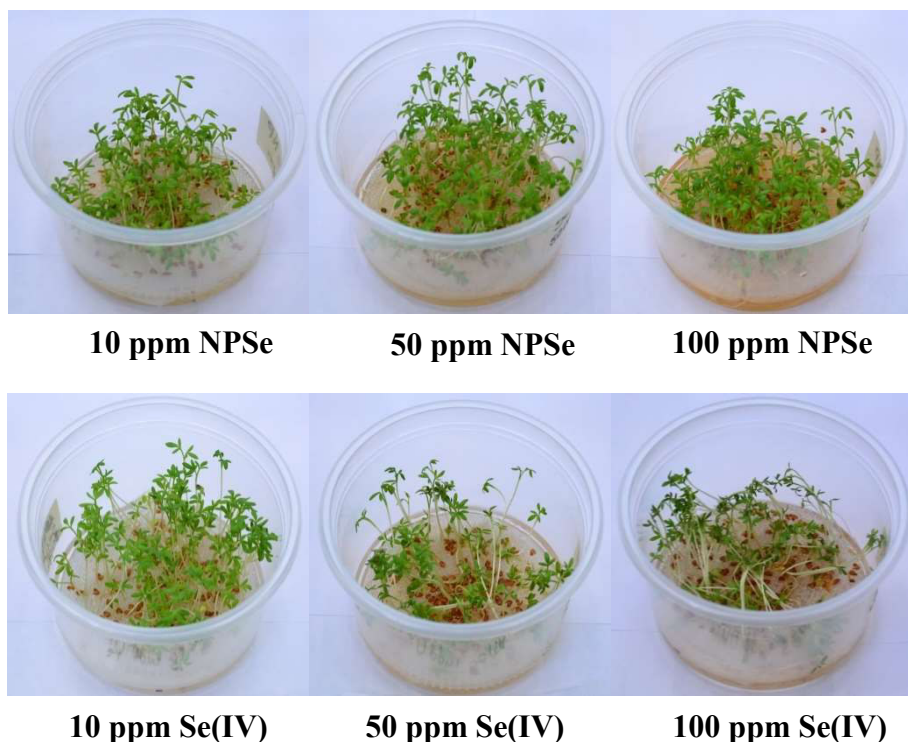


Figura 4.10 Imagen comparativa de *L. sativum* expuesto por 7 días a 10, 50 y 100 mg L⁻¹ tanto de NPSe como de Se(IV).

Resultados de análisis por GC-FID

A manera de un diagnóstico, se llevó a cabo el análisis de los compuestos fenólicos en extractos de las partes aéreas y de raíces de plantas obtenidas bajo diferentes condiciones de exposición. Los resultados GC-FID revelaron diferencias en los perfiles de compuestos fenólicos entre la planta control y plantas expuestas a NPSe o Se(IV), tanto en extractos de la parte aérea (Figura 4.11, 10 mg L⁻¹, Figura 4.12, 100 mg L⁻¹) como en la raíz (Figura 4.13, 10 mg L⁻¹). En particular, para los cromatogramas presentados en las Figuras 4.11-4.13, se agregan insertos correspondientes a las regiones de elución donde se observaron cambios de mayor magnitud.

A pesar del carácter semi-cuantitativo de la técnica GC-FID, estos resultados fueron alentadores, puesto que confirman el impacto de selenio en el metabolismo secundario en berros reportado anteriormente para Se(IV) (hasta 2 mg L⁻¹ en medio [113]) y sugieren que dicho efecto podría ser diferente para NPSe respecto Se(IV); sin embargo, la presencia de NPs tuvo un efecto mucho menor respecto a Se(IV), por lo que a continuación el trabajo se enfocó en los efectos del ión selenito. Con el fin de obtener datos cuantitativos, se procedió con el análisis de las fracciones de biomasa y de los medios de cultivos gastados (conteniendo exudados de planta), utilizando

cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica y fluorimétrica.

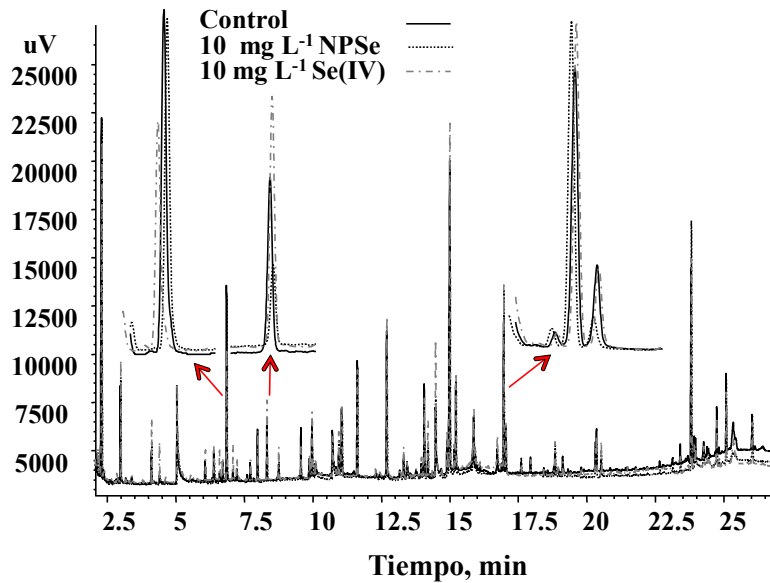


Figura 4.11 Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la parte aérea de *L. sativum* control, 10 mg L⁻¹ de NPSe y 10 mg L⁻¹ de Se(IV).

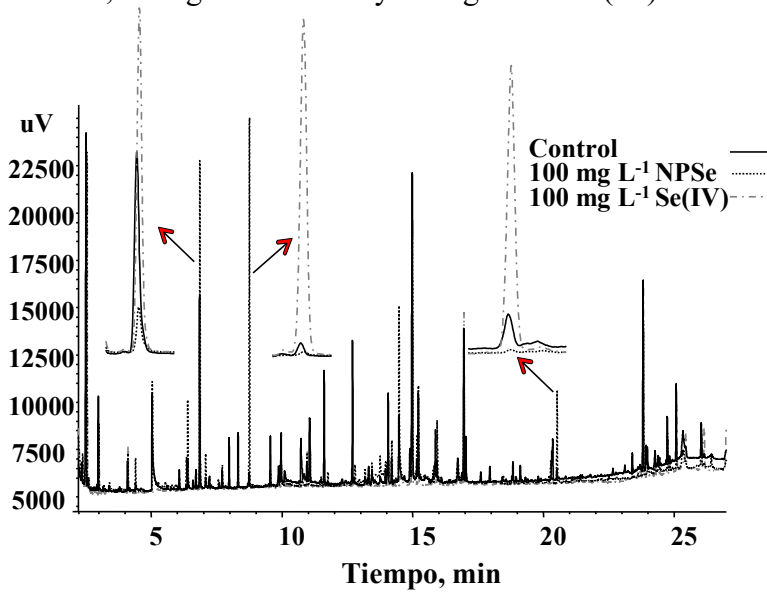


Figura 4.12 Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la parte aérea de *L. sativum* control, 100 mg L⁻¹ de NPSe y 100 mg L⁻¹ de Se(IV).

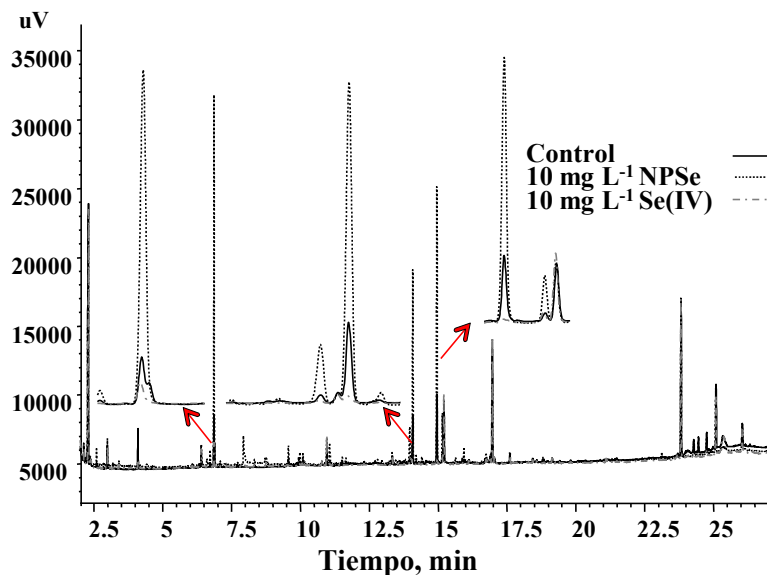


Figura 4.13 Ejemplos de cromatogramas GC-FID obtenidos para extractos de biomasa de la raíz de *L. sativum* control, 10 mg L⁻¹ de NPSe y 10 mg L⁻¹ de Se(IV).

Análisis en el medio de cultivo por HPLC-DAD/FLD

Se utilizó el sistema cromatográfico descrito en la parte experimental [113, 126], en la Figura 4.14 se presentan dos típicos cromatogramas obtenidos para la mezcla de estándares de compuestos fenólicos (Tabla 4.4.), 2.5 mg L⁻¹ cada uno de ellos. Estos cromatogramas fueron registrados empleando el detector espectrofotométrico de arreglo de diodos (DAD) y el detector fluorimétrico (FLD). Los tiempos de retención, condiciones de detección y los parámetros evaluados en el proceso de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos se resumen Tabla 4.4. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de extractos de planta y de medios de cultivos; la identificación de compuestos fenólicos se obtuvo con base en los tiempos de retención y espectros UV-Vis comparándolos con los estándares (Tabla 4.4).

A manera de ejemplo, en la Figura 4.15 se muestra el cromatograma obtenido para el extracto del medio gastado obtenido a partir del tratamiento con 100 mg L⁻¹ de Se(IV). Los compuestos encontrados en estas muestras corresponden a exudados de plantas y estos fueron: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido salicílico, ácido benzoico y cumarina (Tabla 4.5).

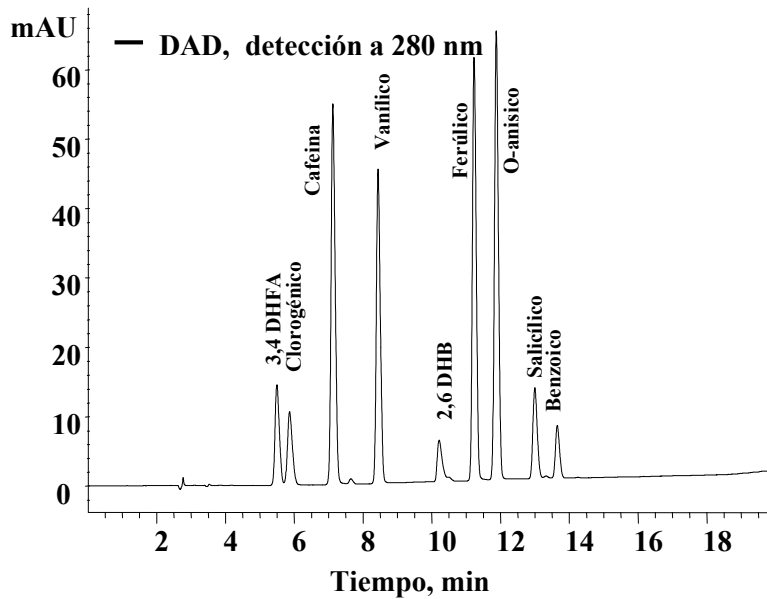
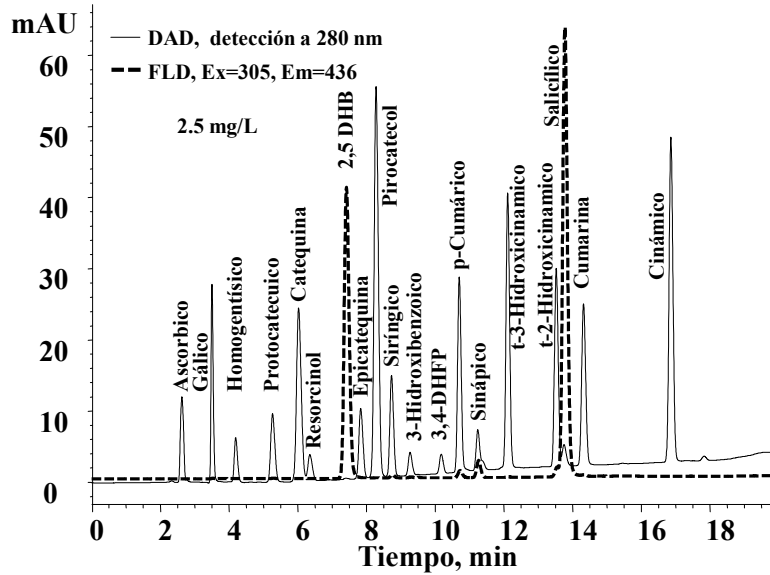


Figura 4.14 Cromatogramas típicos HPLC-DAD/FLD de una mezcla de 19 estándares (arriba) y 9 en otra corrida (Ex=305, Em=436).

La cuantificación se llevó a cabo mediante la calibración externa, utilizando el área del pico y condiciones de detección presentadas en la Tabla 4.4. En las Figuras 4.16 se presentan resultados obtenidos para cada uno de los compuestos fenólicos identificados, dependiendo de la concentración de Se(IV) en el medio.

Tabla 4.5 Lista de compuestos encontrados en el análisis de los exudados de *L. Sativum* expuesto a Se(IV), mediante HPLC – DAD/FLD, marcando los tiempos de retención, condiciones de detección y presencia en las muestras reales.

Compuesto	t retención (min)	presente en medio de cultivo	Presente en fracciones	Condiciones de detección
A. cítrico	2.60			
Ácido gálico	3.48	Si		254 nm
A. homogentísico	4.19			
A. protocatecuico	5.26	Si	Si	254 nm
A. 2,5-dihidroxibenzoico	7.42	Si	Si	Ex=305, Em= 436
Epicatequina	7.81			
A. p-hidroxibenzoico	7.84	Si	Si	254 nm
A. vanílico	8.59		Si	Ex=305, Em= 365
A. siríngico	8.72	Si	Si	280 nm
A. p-cumárico	10.70		Si	280 nm
A. sinápico	11.26		Si	325 nm
A. salicílico	13.80	Si	Si	Ex=305, Em=407
A. benzoico	13.82	Si	Si	280 nm
Cumarina	14.33	Si		280 nm

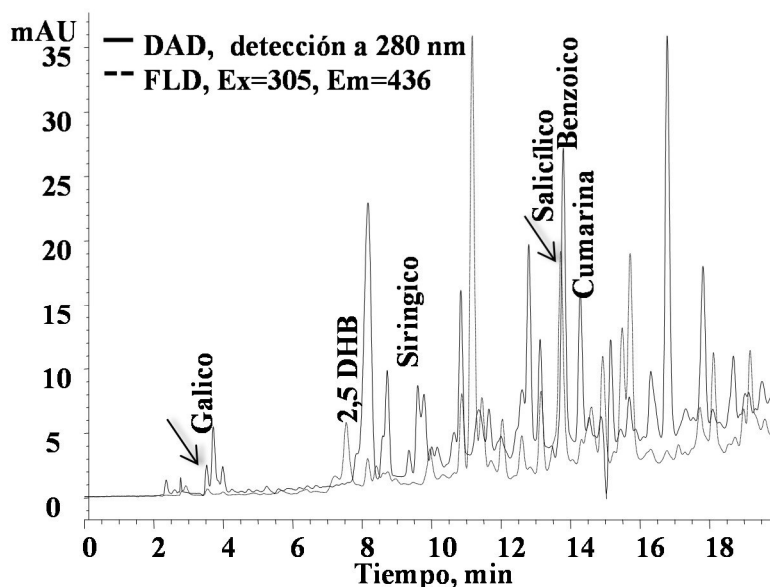


Figura 4.15 Cromatograma HPLC-DAD/FLD típico del medio de cultivo de berros expuestos por una semana a 100 mg L⁻¹ de Se(IV) detección DAD (280 nm, línea sólida) y FLD (Ex=305, Em=436, línea punteada).

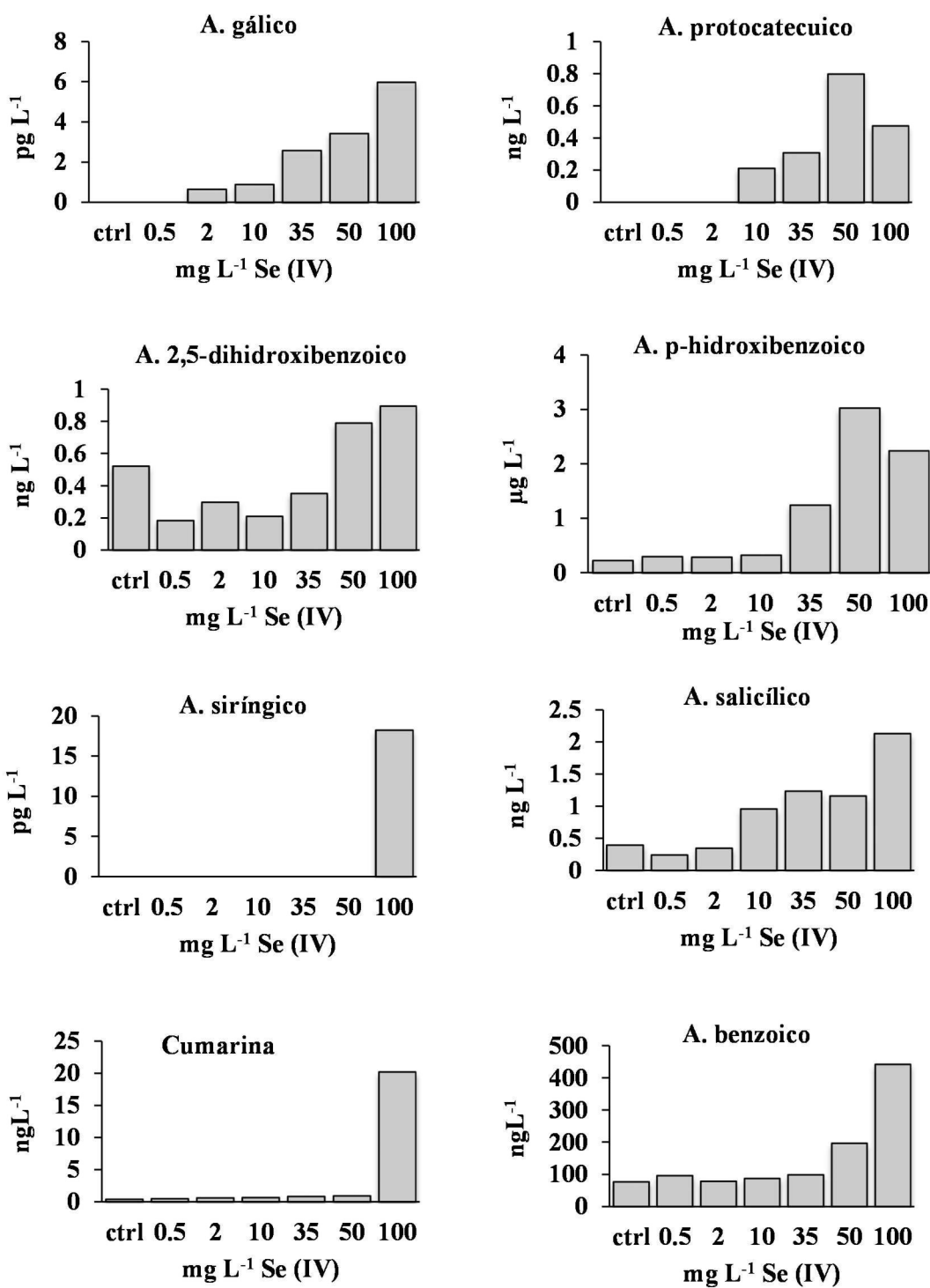


Figura 4.16 Graficas de cuantificación de los compuestos identificados en el medio de cultivo de berros a diferentes concentraciones de Se(IV). Las condiciones de detección se muestran en la Tabla 4.4.

Compuestos no identificados

Además de los compuestos fenólicos identificados en el medio de cultivo, a partir de los cromatogramas se detectaron otros cuatro compuestos, cuya concentración fue afectada por la exposición de la planta a Se(IV); estos compuestos se eluyeron con tiempos de retención 5.65, 8.26, 12.8 y 13.76 min, respectivamente. En la Figura 4.17 se presentan las áreas de picos correspondientes a los compuestos no identificados, donde se observan los cambios, dependiendo de la concentración del ion estresante en medio.

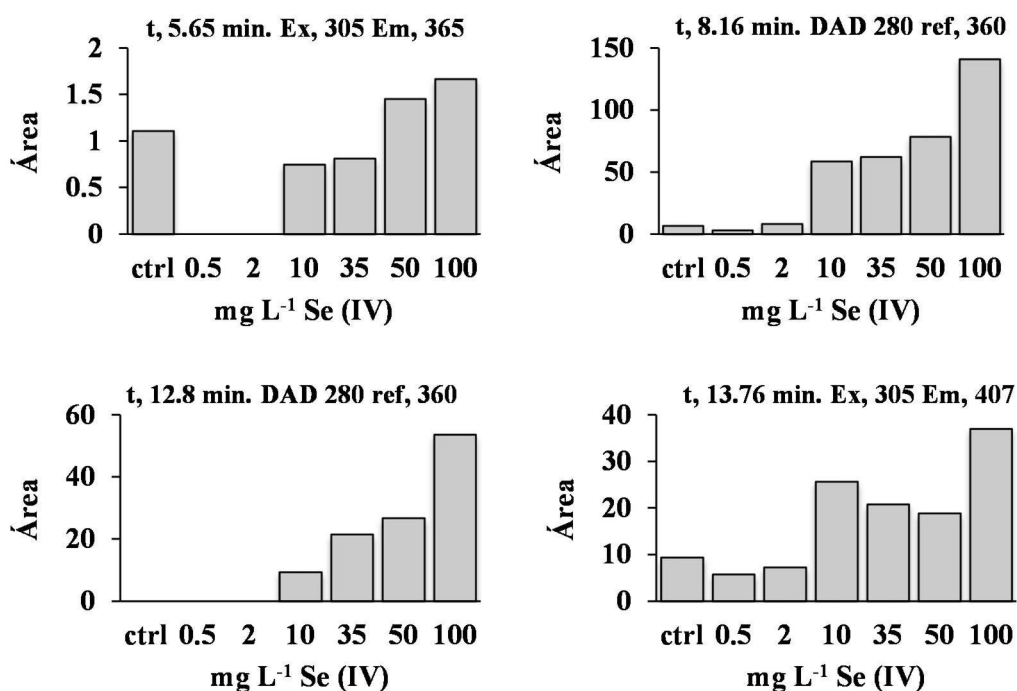


Figura 4.17 Área de compuestos no identificados, los cuales varían su concentración en función de la concentración de Se(IV) a la que fueron expuestas las plantas.

Análisis estadístico

En búsqueda de posibles relaciones entre las condiciones de exposición y los niveles de concentración de ocho compuestos identificados así como los cuatro aún sin identificar en el exudado de *L. sativum*, se llevó a cabo el análisis multivariante por el método de componentes principales (PCA). En el caso de los doce compuestos mencionados con las seis diferentes concentraciones de Se(IV) (0.5, 2, 10, 35, 50 y 100 mg L⁻¹) más los resultados obtenidos para la planta control, se construyó el modelo, en el cual los dos primeros componentes principales

describen el 91% de la varianza total de los datos monitoreados (Figura 4.18). De igual manera, se obtuvo el modelo PCA considerando solamente las concentraciones de ocho compuestos identificados, obteniéndose ligeramente mejores parámetros estadísticos, ya que los dos primeros PC describen 95% de la varianza total de los datos (Figura 4.19). En las Figuras 4.19a y 4.19b se observa la separación del cultivo expuesto a 100 mg L⁻¹ Se(IV) del resto de los cultivos; asimismo en las Figuras 4.18b y 4.19b todos los compuestos fenólicos forman una agrupación en el espacio correspondiente al cultivo expuesto a mayor concentración del ion estresante, lo que indica que una alta concentración de Se en el medio provocó graves daños en la planta con liberación indiscriminada de compuestos fenólicos hacia el exterior.

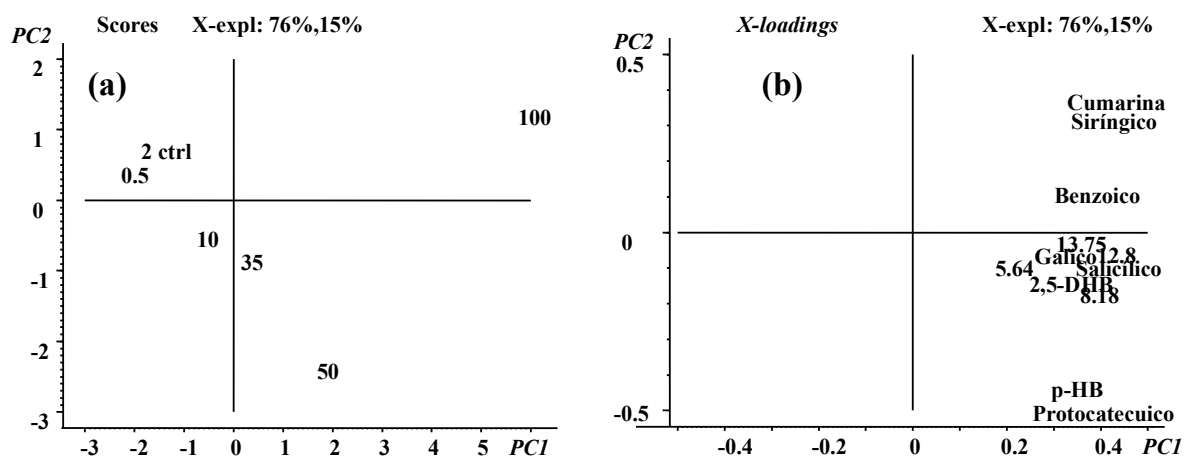


Figura 4.18 Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 12 compuestos determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10, 35, 50 y 100 mg L⁻¹. (a) Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y (b) gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.

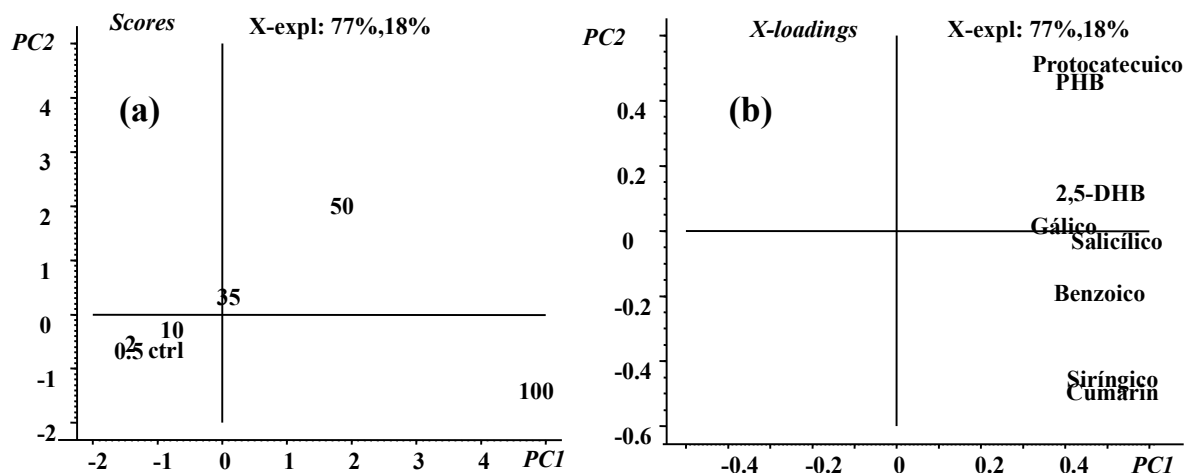


Figura 4.19 Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 8 compuestos identificados y determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10, 35, 50 y 100 mg L⁻¹. **a-** Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y **b-** gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.

Con base en estos resultados, se decidió eliminar los cultivos expuestos a 100 y 50 mg L⁻¹ de Se(IV) y repetir el análisis PCA tomando concentraciones de doce compuestos (Figura 4.20); en este tercer modelo PCA los dos primeros componentes principales describen el 88% de la varianza de los datos.

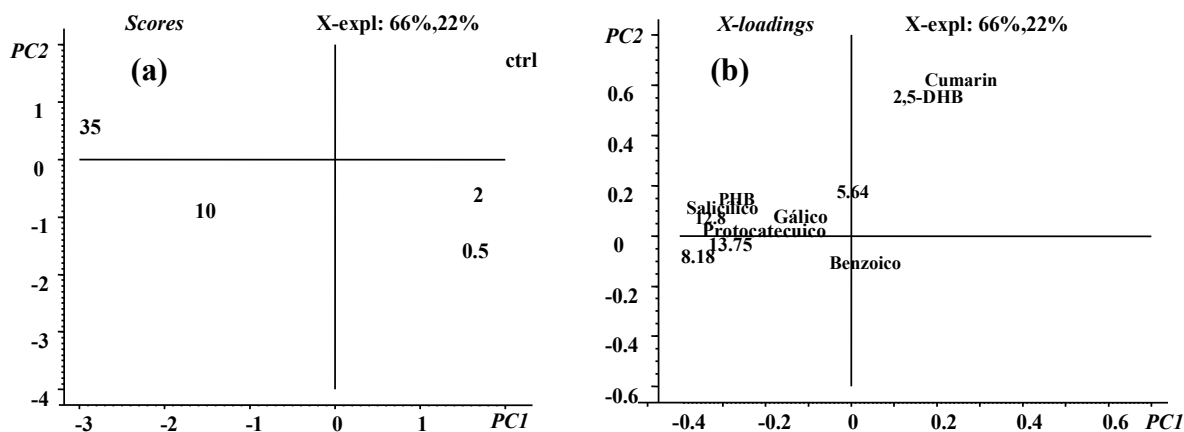


Figura 4.20 Modelo de PCA obtenido con base en las concentraciones de 12 compuestos determinados en cultivos expuestos a Se(IV): 0.5, 2, 10 y 35 mg L⁻¹. (a) Gráfica de “scores” corresponde a la distribución de las muestras y (b) gráfica de “X-loadings” representa las posibles relaciones entre los parámetros medidos para cada muestra.

De la distribución de los cultivos en las coordenadas de PC1 y PC2 (Figura 4.20a) se deduce que

las condiciones de exposición son modeladas por el componente PC1 de tal manera que el valor más positivo de PC1 corresponde a cultivo control y el valor más negativo a cultivo en 35 mg L⁻¹ Se(IV). En la Figura 4.20b se presenta la distribución de variables del sistema, donde se observa claramente dos agrupaciones: cumarina y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico aparecen asociados con bajas concentraciones de Se(IV) en el medio, mientras que el resto de los compuestos forma un clúster en el espacio correspondiente a los cultivos tratados con 10 y 35 mg L⁻¹ Se(IV). Estos resultados sugieren que el selenio activa el metabolismo de compuestos fenólicos y que este efecto depende de la concentración del ion estresante en el medio.

Se llevó a cabo el análisis estadístico de correlación considerando las concentraciones de compuestos fenólicos encontrados en cada una de las condiciones de exposición y los resultados de este análisis se presentan en Tabla 4.6. En primer lugar se observa que existe estadísticamente significativa correlación directa entre la concentración de Se(IV) en el medio y los niveles de pHB, cumarina, ácido salicílico, procatecuico y gálico, confirmando que la creciente concentración de Se(IV) en medio activa la exudación de por lo menos estos compuestos fenólicos. Debido a su carácter antioxidante, estos compuestos podrían participar en la reducción de Se(IV) a Se⁰, observada en los cultivos expuestos.

Por lo que respecta a las relaciones entre los exudados en el medio de cultivo (Tabla 4.6), se han detectado correlaciones estadísticamente significativas entre cuatro ácidos fenólicos: gálico, p-hidroxibenzoico, salicílico y procatecuico (además de cumarina, Figura 4.21). Estos compuestos C6-C1 se generan en plantas en la ruta del ácido shikímico, a partir de los fenilpropanoides (derivados del ácido cinámico), mediante la eliminación de dos carbonos de la cadena propánica y formación del ácido benzoico. El ácido benzoico es el metabolito clave en condiciones de estrés, ya que las plantas lo utilizan en la síntesis de compuestos defensivos y de reguladores de crecimiento. En el caso de los compuestos encontrados en exudados de berros, el ácido salicílico es una fitohormona universal así como una molécula de señalización durante las reacciones de defensa en condiciones de estrés; por su parte, el ácido protocatecuico tiene propiedades antimicrobianas, mientras que los ácidos gálico y p-hidroxibenzoico son precursores de polifenoles tales como taninos y ubiquinonas, respectivamente. En los exudados de berros, el ácido benzoico fue encontrado como compuesto fenólico mayoritario (Figura 4.15), pero no se observó correlación significativa de este ácido con ninguno de los fenólicos derivados de él (Tabla 4.6). La falta de dicha correlación probablemente se debe al hecho que el ácido benzoico se encuentra en

exudados como un producto de degradación de compuestos aromáticos en general.

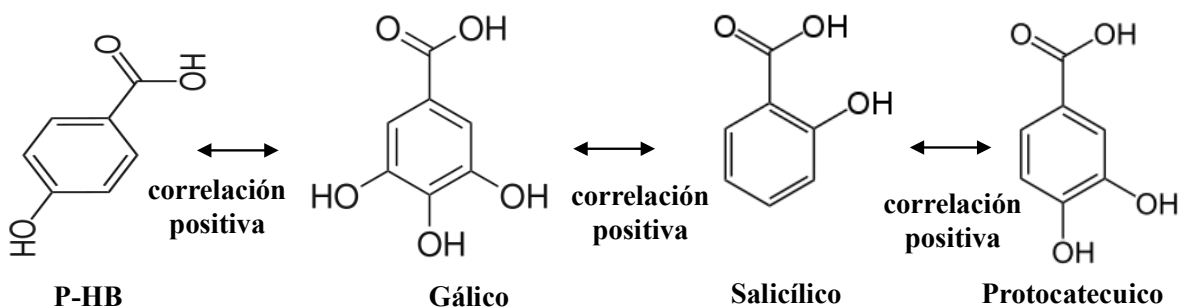


Figura 4.21 Esquema de la correlación encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica en el medio de cultivo para concentraciones de Se(IV) de 0.5, 2, 10 y 35 mg L⁻¹ así como el control.

Tabla 4.6 Análisis de correlación entre las condiciones de exposición y concentraciones de compuestos fenólicos encontrados en el medio de cultivo para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

	medio	2,5-DHB	p-HB	benzoico	cumarina	salicílico	protocatecuico	gálico
medio		0.0270 p=0.966	0.9751 p= 0.005	00.6435 p=0.241	0.8811 p= 0.048	0.9083 p= 0.033	0.9168 p= 0.028	0.9776 p= 0.004
2,5-DHB	0.0270 p=0.966		0.0829 p=0.895	-0.5247 p=0.364	-0.2174 p=0.725	-0.0218 p=0.972	-0.1281 p=0.837	-0.0062 p=0.992
p-HB	0.9751 p= 0.005	0.0829 p=0.895		0.6698 p=0.216	0.8139 p=0.094	0.7947 p=0.108	0.8089 p=0.097	0.9441 p= 0.016
benzoico	0.6435 p=0.241	-0.5247 p=0.364	0.6698 p=0.216		0.4886 p=0.404	0.4916 p=0.400	0.5911 p=0.294	0.5491 p=0.338
cumarina	0.8811 p= 0.048	-0.2174 p=0.725	0.8139 p=0.094	0.4886 p=0.404		0.8520 p=0.067	0.8614 p=0.061	0.9520 p= 0.013
salicílico	0.9083 p= 0.033	-0.0218 p=0.972	0.7947 p=0.108	0.4916 p=0.400	0.8520 p=0.067		0.9919 p= 0.001	0.8924 p= 0.042
protocatecuico	0.9168 p= 0.028	-0.1281 p=0.837	0.8089 p=0.097	0.5911 p=0.294	0.8614 p=0.061	0.9919 p= 0.001		0.8938 p= 0.041
gálico	0.9776 p= 0.004	-0.0062 p=0.992	0.9441 p= 0.016	0.5491 p=0.338	0.9520 p= 0.013	0.8924 p= 0.042	0.8938 p= 0.041	

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis de los exudados de berros indicaron que él Se(IV) (hasta 35 mg L⁻¹ en medio) activa la exudación de ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico, considerados como participantes de los mecanismos defensivos de la planta en condiciones de estrés; en este sentido, la propiedad común de los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, salicílico y procatecuico es su carácter antioxidante; los fenólicos exudados podrían entonces ser considerados como reductores de Se(IV).

Análisis de compuestos fenólicos libres (F1), unidos a glicósidos (F2) y unidos a pared (F3) en partes aéreas y en raíces de berros bajo diferentes condiciones de exposición

Utilizando los mismos parámetros cromatográficos que para el medio de cultivo, se determinó la concentración de los fenólicos extraídos para cada una de las fracciones de biomasa (Tabla 4.7, condiciones de extracción y análisis descrito en las condiciones experimentales). A manera de ejemplo, se muestran dos cromatogramas típicos obtenidos para F1 (fenólicos libres) de la parte aérea y de la raíz del cultivo expuesto a 35 mg L^{-1} Se(IV), utilizando dos sistemas de detección en línea: FLD (Ex=305, Em=436, Figura 4.22) y DAD a 254 nm (Figura 4.23).

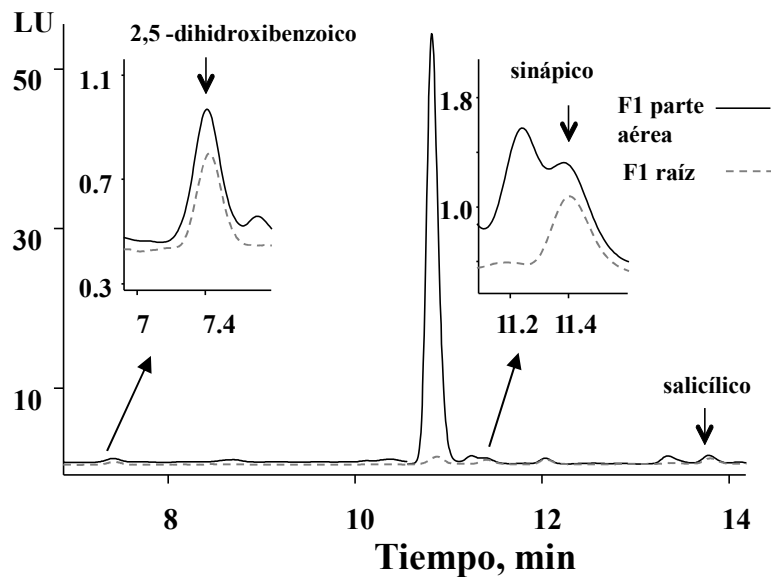


Figura 4.22 Típicos cromatogramas HPLC-FLD obtenidos en el análisis de la fracción F1 (fenólicos libres) de la parte aérea y de raíces de berros expuestos por una semana a 35 mg L^{-1} de Se(IV), detección FLD (Ex=305, Em=436).

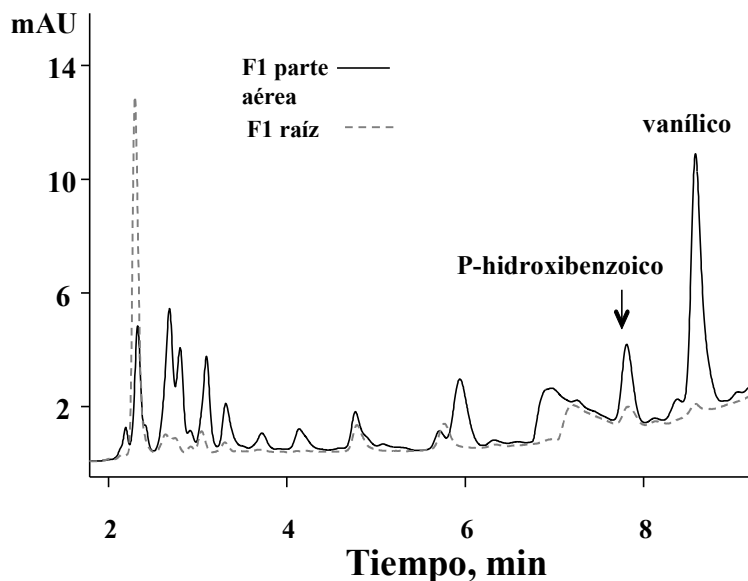


Figura 4.23 Típicos cromatogramas HPLC-DAD obtenidos en el análisis de la fracción F1 (fenólicos libres) de parte aérea y de raíces de berros expuestos por una semana a 35 mg L^{-1} de Se(IV), detección DAD 254 nm.

Con base en los estándares mencionados en la Tabla 4.4, los compuestos identificados en los extractos de biomasa fueron: ácido sinápico, cumárico, 2,5-dihidroxi benzoico, vanílico, salicílico, benzoico, *p*-hidroxi benzoico, siringico y procatecuico. Cabe mencionar que, además de los ácidos fenólicos encontrados en exudados, en biomasa se detectó la presencia de ácido sinápico, *p*-cumárico y vanílico. Parece relevante que los residuos de alcoholes siringil o sinapil y *p*-cumaril se encuentran en la estructura de lignina, mientras que los respectivos ácidos se reportan como productos de degradación de este polímero. En la Tabla 4.7 se presentan los resultados de determinación de nueve compuestos en fracciones 1, 2 y 3 obtenidos para la parte aérea y para las raíces de los berros bajo diferentes condiciones de exposición. Se puede observar que el tratamiento con Se(IV) provocó cambios en el perfil de los compuestos fenólicos en la planta y que estos cambios fueron más notorios en las fracciones 1 y 2 respecto a la fracción 3 y también más marcados en raíces respecto a la parte aérea. Con base en los resultados obtenidos, se llevó a cabo el análisis estadístico para observar las posibles relaciones entre las condiciones de exposición y variables del sistema.

Tabla 4.7 Concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$; biomasa liofilizada) de los compuestos encontrados en fracciones F1, F2 y F3 de biomasa (A- parte aérea, R – raíz) para diferentes condiciones de exposición (0 – 100 mg L^{-1} Se(IV)

Fracción	Compuesto ($\mu\text{g/g}$ biomasa) Se (IV) mg L^{-1}	Sinápico	Cumárico	2,5-DHB	Vanílico	Salicílico	Benzoico	p-HB	Siríngico	Protocat ecuico
		<i>DAD 325 nm</i>	<i>DAD 280 nm</i>	<i>Ex=305, Em=436</i>	<i>Ex=305, Em=365</i>	<i>Ex=305, Em=407</i>	<i>DAD 280 nm</i>	<i>DAD 254 nm</i>	<i>DAD 280 nm</i>	<i>DAD 254 nm</i>
F1A0	0	4.99	0.70	0.07	0.49	0.08	4.67	0.17	0.26	0.03
F1A0.5	0.5	5.31	1.40	0.07	0.52	0.08	3.42	0.20	0.27	0.03
F1A2	2	2.34	1.08	0.05	0.50	0.07	5.81	0.23	0.33	0.02
F1A10	10	3.71	0.94	0.05	0.44	0.07	6.38	0.35	0.94	–
F1A35	35	2.73	1.08	0.04	0.49	0.07	10.2	0.24	0.84	0.02
F1A50	50	2.34	1.46	0.15	0.47	0.08	13.2	0.30	1.05	0.02
F1A100	100	0.72	2.17	0.15	0.50	0.13	20.8	0.37	2.31	0.03
F1R0	0	2.42	–	0.05	1.18	0.13	3.49	0.33	0.19	0.02
F1R0.5	0.5	0.63	–	0.05	1.34	0.14	3.88	0.35	0.08	0.03
F1R2	2	1.04	–	0.05	1.08	0.11	4.44	0.34	0.13	0.02
F1R10	10	0.53	–	0.03	1.47	0.15	3.64	0.42	0.18	0.04
F1R35	35	–	–	0.09	1.52	0.17	9.61	0.60	0.79	0.05
F1R50	50	–	–	0.18	1.50	0.17	8.84	0.63	1.04	0.03
F1R100	100	–	–	0.27	1.35	0.15	9.11	0.36	2.26	0.04
F2A0	0	68.9	–	3.36	0.49	0.09	–	9.77	5.25	1.69
F2A0.5	0.5	10.7	–	1.99	0.52	0.18	–	18.7	5.75	1.81
F2A2	2	42.1	–	3.10	0.50	0.08	–	8.67	4.22	1.20
F2A10	10	54.1	–	4.70	0.44	0.11	–	6.16	6.19	0.89
F2A35	35	56.3	–	3.80	0.49	0.12	–	4.56	5.55	0.55
F2A50	50	49.8	–	3.67	0.47	0.16	–	5.59	4.65	0.62
F2A100	100	25.2	–	1.92	0.50	0.10	–	3.07	4.75	0.30
F2R0	0	13.4	–	1.16	1.18	0.15	8.58	1.87	2.26	0.56
F2R0.5	0.5	0.46	–	0.09	1.34	0.14	4.42	4.97	1.23	0.21
F2R2	2	0.67	–	0.08	1.08	0.20	10.3	3.22	1.60	0.32
F2R10	10	13.5	–	1.28	1.47	0.28	3.93	9.24	4.71	0.58
F2R35	35	8.71	–	0.67	1.52	0.20	2.29	3.66	3.19	0.35
F2R50	50	6.54	–	0.29	1.50	0.22	2.64	2.30	1.62	0.18
F2R100	100	9.40	–	0.19	1.35	0.26	3.85	2.53	1.75	0.17
F3A0	0	8.59	–	–	–	0.10	–	0.58	–	0.02
F3A0.5	0.5	9.10	–	–	–	0.11	1.52	0.71	–	0.02
F3A2	2	6.27	–	–	–	0.10	1.34	0.63	–	0.02
F3A10	10	7.77	–	–	–	0.09	1.05	0.53	–	0.03
F3A35	35	9.09	–	–	–	0.10	1.73	0.79	–	0.03
F3A50	50	7.49	–	–	–	0.11	2.96	0.73	–	0.06
F3A100	100	6.09	–	–	–	0.11	3.38	0.70	–	0.16
F3R0	0	0.86	–	–	–	0.22	2.89	1.39	–	0.06
F3R0.5	0.5	2.66	–	–	–	0.28	5.56	4.25	–	0.09
F3R2	2	4.31	–	–	–	0.22	4.05	3.23	–	0.10
F3R10	10	4.55	–	–	–	0.29	5.97	3.06	–	0.14
F3R35	35	13.6	–	–	–	0.29	6.72	6.37	–	0.69
F3R50	50	5.74	–	–	–	0.30	5.63	5.46	–	0.78
F3R100	100	10.2	–	–	–	0.25	6.52	5.53	–	1.05

Análisis estadístico

En la Figura 4.24 se presenta el modelo PCA obtenido tomando las concentraciones de fenólicos determinadas en las fracciones F1, F2 y F3 de la parte aérea de las plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como de la planta control. Con este análisis se trató de determinar los compuestos posiblemente asociados con cada una de las fracciones de biomasa. En la Figura 4.24a, se observa que las muestras analizadas forman tres agrupaciones, correspondientes a las fracciones F1, F2, F3 – lo que confirma que los dos primeros componentes principales permiten representar los datos del sistema en el espacio bidimensional, de acuerdo con sus características más importantes. Por otra parte, la Figura 4.24b muestra que los ácidos benzoico y cumárico aparecen asociados con la fracción F1, mientras que el resto de compuestos forma un clúster en el espacio correspondiente a la fracción F2. En este análisis, las condiciones de exposición a Se(IV) no tuvo efecto importante en la composición de fenólicos en la fracción F3 de las partes aéreas de la planta.

Tabla 4.8. Análisis de correlación entre los diferentes compuestos encontrados en F1 parte aérea para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

	Se(IV)	Sinápico	Cumárico	2,5 DHB	Vanílico	Salicílico	Benzoico	p-HB	Siríngico	Protocatecuico
Se(IV)		-0.5258 p=0.363	0.0385 p=0.951	-0.7197 p=0.170	-0.1597 p=0.798	-0.3566 p=0.556	0.9539 p=0.012	0.2656 p=0.666	0.7342 p=0.158	-0.1629 p=0.793
Sinápico	-0.5258 p=0.363		0.0367 p=0.953	0.9535 p=0.012	0.1542 p=0.804	0.7945 p=0.108	-0.7182 p=0.172	-0.4037 p=0.500	-0.4393 p=0.459	0.2536 p=0.681
Cumárico	0.0385 p=0.951	0.0367 p=0.953		0.1483 p=0.812	0.5899 p=0.295	0.2393 p=0.698	-0.1386 p=0.824	-0.0405 p=0.948	-0.1190 p=0.849	0.1914 p=0.758
2,5 DHB	-0.7197 p=0.170	0.9535 p=0.012	0.1483 p=0.812		0.3172 p=0.603	0.8157 p=0.092	-0.8793 p=0.049	-0.4848 p=0.408	-0.6474 p=0.238	0.3581 p=0.554
Vanílico	-0.1597 p=0.798	0.1542 p=0.804	0.5899 p=0.295	0.3172 p=0.603		0.6830 p=0.204	-0.2649 p=0.667	-0.8023 p=0.102	-0.7263 p=0.165	0.8971 p=0.039
Salicílico	-0.3566 p=0.556	0.7945 p=0.108	0.2393 p=0.698	0.8157 p=0.092	0.6830 p=0.204		-0.5528 p=0.334	-0.8395 p=0.075	-0.7105 p=0.179	0.7749 p=0.124
Benzoico	0.9539 p=0.012	-0.7182 p=0.172	-0.1386 p=0.824	-0.8793 p=0.049	-0.2649 p=0.667	-0.5528 p=0.334		0.3343 p=0.582	0.7370 p=0.155	-0.2321 p=0.707
p-HB	0.2656 p=0.666	-0.4037 p=0.500	-0.0405 p=0.948	-0.4848 p=0.408	-0.8023 p=0.102	-0.8395 p=0.075	0.3343 p=0.582		0.8214 p=0.088	-0.9757 p=0.005
Siríngico	0.7342 p=0.158	-0.4393 p=0.459	-0.1190 p=0.849	-0.6474 p=0.238	-0.7263 p=0.165	-0.7105 p=0.179	0.7370 p=0.155	0.8214 p=0.088		-0.7853 p=0.115
Protocatecuico	-0.1629 p=0.793	0.2536 p=0.681	0.1914 p=0.758	0.3581 p=0.554	0.8971 p=0.039	0.7749 p=0.124	-0.2321 p=0.707	-0.9757 p=0.005	-0.7853 p=0.115	

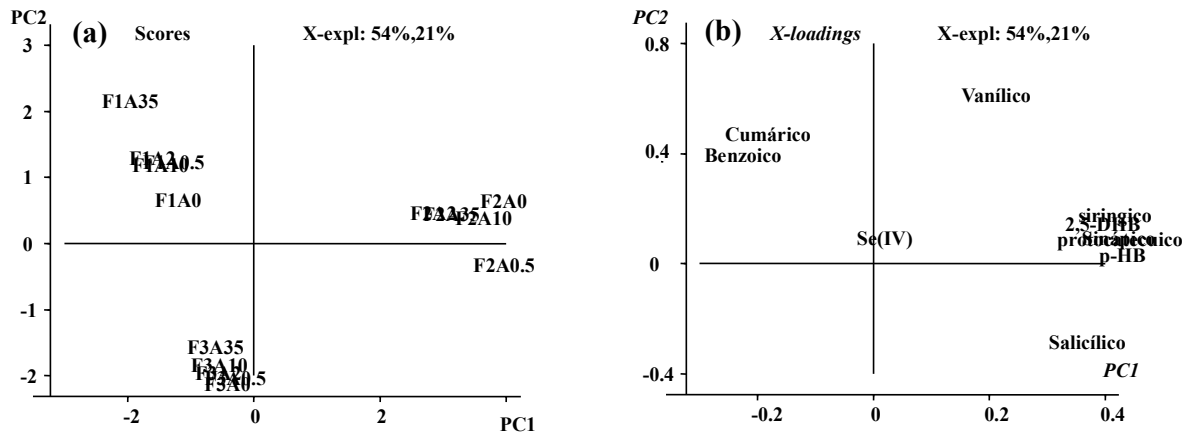


Figura 4.24 Análisis de PCA para F1, F2 y F3 de la parte aérea de las plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

Se llevó a cabo también el análisis de correlación, cuyos resultados se presentan en Tabla 4.8. De manera general, se encontraron cinco pares de variables correlacionados, entre ellos el ácido benzoico y Se(IV) en el medio, esta relación directa parece confirmar la importancia del ácido benzoico como precursor de ácidos fenólicos cuya exudación aumentó en plantas expuestas a Se(IV) (Tabla 4.6). Es de notar que en el modelo PCA (Figura 4.24), el ácido benzoico está asociado con la fracción de fenólicos libres, lo que sugiere que la presencia de Se(IV) en el medio de cultivo activa la síntesis de este compuesto clave para la respuesta defensiva antioxidante de planta.

Con base en los resultados de PCA y del análisis de correlación, (en la Figura 4.25 se presenta el esquema de relaciones entre compuestos fenólicos en F1 de las partes aéreas) parece probable que Se(IV) podría facilitar conversiones entre algunos compuestos fenólicos, como lo indica la correlación inversa entre ácidos benzoico y 2,5-dihydrobenzoico y entre ácidos p-hydrobenzoico y procatecuico.

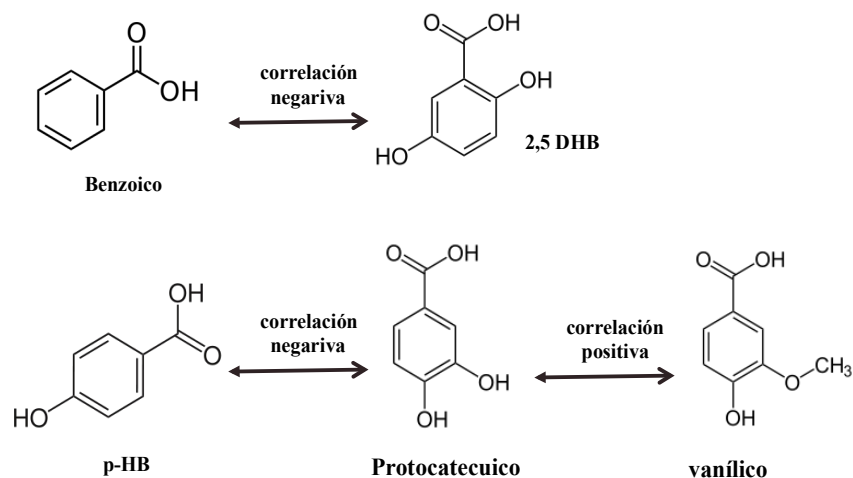


Figura 4.25 Esquema de correlación de encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica para F1 de la parte aérea de plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

Como ya se mencionó anteriormente, los cambios de los compuestos fenólicos en la biomasa de la raíz de la planta fueron más marcados que en las partes aéreas. El modelo PCA obtenido con base en los resultados del análisis de raíces se presenta en la Figura 4.26. De manera similar como para las partes aéreas, los dos primeros componentes principales permiten separar las muestras de acuerdo al tipo de extracto, ya que en la Figura 4.26a se observan tres agrupaciones correspondientes a las fracciones F1, F2 y F3. La distribución de variables en el modelo PCA, representada en la Figura 4.26b indica que el Se(IV) tuvo mayor impacto sobre fenólicos en la fracción F2; parece también interesante la agrupación de Se(IV) con ácido benzoico, puesto que afirma los resultados obtenidos en el análisis de exudados y de partes aéreas.

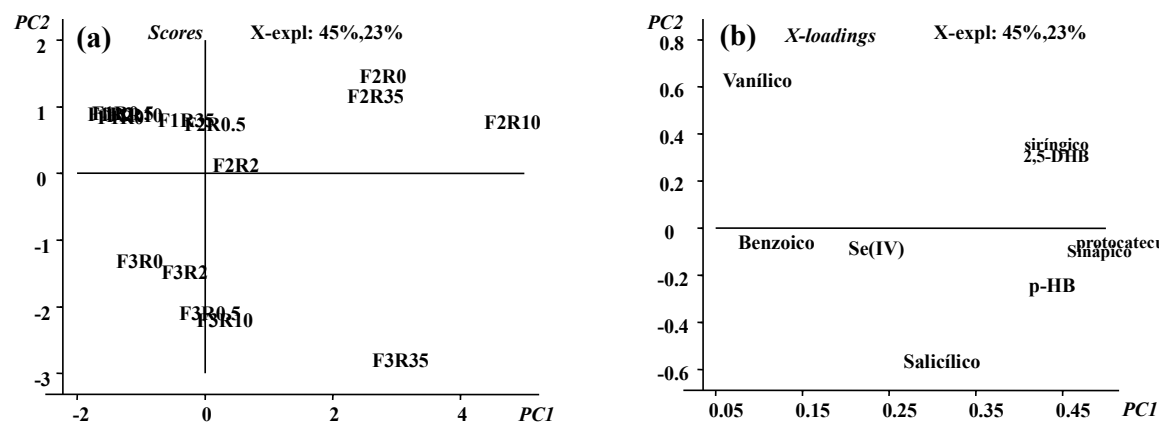


Figura 4.26 Análisis de PCA para F1, F2 y F3 de la raíz de las plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

Para explorar posibles relaciones entre las condiciones de exposición y las concentraciones de compuestos fenólicos individuales en la fracción F1, se llevó a cabo el análisis de correlación (Tabla 4.9). En este caso, se halló la correlación directa entre Se(IV) en el medio de cultivo y las concentraciones de los ácidos benzoico, p-hidroxibenzoico, siríngico y procatecuico en F1 de las raíces. En cuanto a los ácidos benzoico, p-hidroxibenzoico y procatecuico, estos también presentaron correlación con Se(IV) en el análisis de los medios de cultivo, lo que sugiere que la planta sintetiza y exuda estos compuestos en respuesta al estrés por Se(IV). Por otra parte, el ácido siríngico es importante en los procesos de lignificación, lo que sugiere que la exposición a Se(IV) no solamente activa la síntesis y exudación de fenólicos reductores, sino también podría tener efecto en los procesos de lignificación [113, 126].

En cuanto a las relaciones entre compuestos fenólicos, se encontraron seis correlaciones directas estadísticamente significativas para los ácidos: benzoico, p-hidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoico, salicílico, vanílico, siríngico y procatecuico. El esquema de los compuestos relacionados se presenta en la Figura 4.27.

Tabla 4.9 Análisis de correlación entre los diferentes compuestos encontrados en F1 de la raíz para berros expuestos a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

	Se(IV)	Sinápico	2,5 DHB	Vanílico	Salicílico	Benzoico	p HB	Siríngico	Protocatecuico
Se(IV)		-0.6679 p=0.218	0.7455 p=0.148	0.7330 p=0.159	0.7960 p=0.107	0.9458 p=0.015	0.9946 p=0.000	0.9671 p=0.007	0.9184 p=0.028
Sinápico	-0.6679 p=0.218		-0.3179 p=0.602	-0.7196 p=0.171	-0.6402 p=0.245	-0.6009 p=0.284	-0.6996 p=0.188	-0.4875 p=0.405	-0.8530 p=0.066
2,5 DHB	0.7455 p=0.148	-0.3179 p=0.602		0.2936 p=0.632	0.4144 p=0.488	0.9033 p=0.036	0.7100 p=0.179	0.8581 p=0.063	0.5761 p=0.309
Vanílico	0.7330 p=0.159	-0.7196 p=0.171	0.2936 p=0.632		0.9832 p=0.003	0.5354 p=0.352	0.7989 p=0.105	0.5938 p=0.291	0.9068 p=0.034
Salicílico	0.7960 p=0.107	-0.6402 p=0.245	0.4144 p=0.488	0.9832 p=0.003		0.6178 p=0.267	0.8525 p=0.066	0.6970 p=0.191	0.9107 p=0.032
Benzoico	0.9458 p=0.015	-0.6009 p=0.284	0.9033 p=0.036	0.5354 p=0.352	0.6178 p=0.267		0.9196 p=0.027	0.9673 p=0.007	0.8158 p=0.092
p HB	0.9946 p=0.000	-0.6996 p=0.188	0.7100 p=0.179	0.7989 p=0.105	0.8525 p=0.066	0.9196 p=0.027		0.9458 p=0.015	0.9496 p=0.013
Siríngico	0.9671 p=0.007	-0.4875 p=0.405	0.8581 p=0.063	0.5938 p=0.291	0.6970 p=0.191	0.9673 p=0.007	0.9458 p=0.015		0.8087 p=0.097
Protocatecuico	0.9184 p=0.028	-0.8530 p=0.066	0.5761 p=0.309	0.9068 p=0.034	0.9107 p=0.032	0.8158 p=0.092	0.9496 p=0.013	0.8087 p=0.097	

Es de notar que en los dos esquemas de correlaciones (Figura 4.27 y Figura 4.25), participan los ácidos fenólicos con diferentes grupos hidroxilo, además de los ácidos vanílico y siringico que tienen en su estructura grupos metilo. Estos últimos resultados sugieren que el selenio podría jugar un papel en la metilación de ácidos fenólicos, provenientes de la ruta del ácido shikímico.

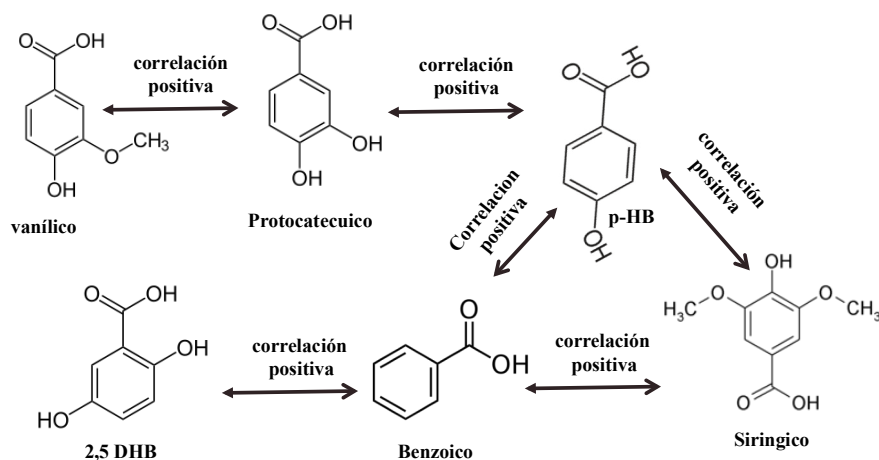


Figura 4.27 Esquema de la correlación encontrada entre ácidos de la misma ruta metabólica para F1 de raíz de plantas expuestas a 0.5, 2, 10 y 35 mg Se(IV) L⁻¹ así como el control.

Evaluación del porcentaje de metilación global del DNA en plantas expuestas a Se(IV)

Los porcentajes de metilación del DNA obtenidos para plantas expuestas a diferentes concentraciones de Se(IV) se presentan en la Tabla 4.10 y en la Figura 4.28. Cabe mencionar que estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente para el intervalo de concentraciones de Se(IV) de 0 a 2 mgSe L⁻¹ en medio de cultivo [51]. En concreto, para una baja concentración de Se(IV) agregada al medio de cultivo (0.5 mg L⁻¹), se observó un aumento de la metilación, mientras que concentraciones más altas del ion estresante provocaron decremento paulatino de la metilación.

Tabla 4.10 Porcentaje de metilación de DNA en *L. sativum* expuesto a Se(IV)

mg L ⁻¹ Se (IV) en medio	% metilación global del DNA
control	13.2
0.5	14.1
2	13.1
10	12.2
35	11.6

Ya se mencionó en la parte introductoria, que la metilación del DNA en plantas ocurre en citosinas que se encuentran no solamente en la secuencia CpG sino también en CpHpG y CpHpH (H – representa cualquier base excepto guanina) y la metilación global alcanza porcentajes relativamente altos (14% en *Arabidopsis*). De manera general, esta alta metilación en plantas asegura estabilidad del DNA genómico y lo protege contra posibles mutaciones relacionadas con la abundante presencia de factores bióticos y abióticos a los que está expuesta la planta. En este sentido, el aumento del porcentaje de metilación en presencia de baja concentración de Se(IV), observada en este trabajo, debe interpretarse como un elemento de la maquinaria defensiva de *L. sativum*, de igual manera como la síntesis de los compuestos fenólicos. Por otro lado, el decremento del porcentaje de metilación detectado conforme aumentaba la concentración de Se(IV) fue un síntoma de fitotoxicidad de selenio.

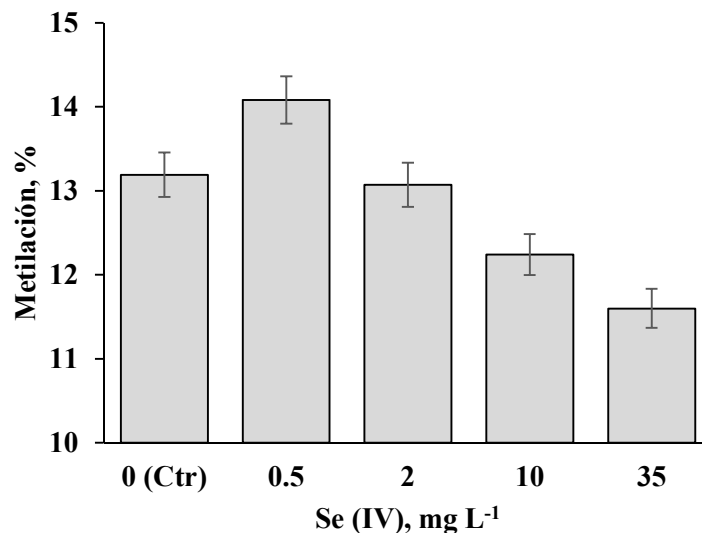


Figura 4.28 Efecto de Se(IV) sobre el porcentaje de metilación global de DNA en *Lepidium sativum*.

Posible asociación entre Se(IV) agregado al medio, compuestos fenólicos y grado de metilación del DNA en L. sativum

Los resultados obtenidos y descritos en esta parte del trabajo confirman que el estrés abiótico impuesto por Se(IV) a bajas concentraciones, activa los mecanismos defensivos de la planta estudiada y que en presencia del exceso de Se(IV) ocurren síntomas de toxicidad (50 – 100 mgSe L⁻¹ en medio). Los aspectos más relevantes se presentan a continuación:

1. Una de las respuestas defensivas de los berros fue la síntesis y exudación de compuestos fenólicos, que por sus propiedades contribuyeron en la reducción de Se(IV) a Se⁰, disminuyendo la biodisponibilidad del elemento. Los compuestos clave parecen ser el ácido benzoico y los ácidos derivados de él: ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, salicílico y procatecuico.
2. Al interior de la planta, la exposición a Se(IV) también tuvo impacto en los perfiles de compuestos fenólicos, observándose los cambios más notorios en las raíces respecto a las partes aéreas. En las partes aéreas, los cambios mayores ocurrieron en los niveles de los compuestos fenólicos libres y los unidos a glicósidos (fracción F1 y F2, respectivamente), mientras que en las raíces, los cambios importantes fueron detectados en F2.
3. Con base en el análisis estadístico de los datos obtenidos para partes aéreas, además de estimular la síntesis de compuestos fenólicos (ácido benzoico), el Se(IV) podría facilitar conversiones entre algunos de estos compuestos – así lo sugiere la correlación inversa entre ácidos benzoico y 2,5-dihidroxibenzoico y entre ácidos p-hidroxibenzoico y procatecuico. Cabe mencionar, que los tres últimos ácidos contienen un mayor número de grupos hidroxilo en sus moléculas respecto al ácido benzoico. Es interesante también la correlación directa entre los ácidos procatecuico y vanílico; un hidrógeno del grupo hidroxilo en el primero es sustituido por un grupo metilo en el segundo.
4. En las raíces, de manera similar que en el medio gastado, los ácidos benzoico, p-hidroxibenzoico y procatecuico, fueron asociados con las crecientes concentraciones de Se(IV) en el medio, reforzando la propuesta de que la planta sintetiza y exuda estos compuestos en respuesta al estrés impuesto por selenio. En el análisis de raíces, se detectó también una asociación de Se(IV) con el ácido sirínico, lo que sugiere que podrían favorecerse los procesos de lignificación. Los procesos de lignificación conducen al refuerzo de la pared celular que también es considerado un mecanismo defensivo de las plantas para impedir la captación del agente estresante [126].
5. El esquema de correlaciones entre ácidos fenólicos en raíces de plantas bajo diferentes condiciones de estrés (Figura 4.27 y Figura 4.25) involucra compuestos con diferente número de grupos hidroxilo y además a los ácidos vanílico y sirínico que tienen en su estructura grupos metilo. Estos resultados sugieren que la exposición al Se(IV) podría afectar el grado de hidroxilación y/o metilación de ácidos fenólicos, provenientes de la ruta del ácido shikímico.
6. El papel de Se en los procesos de biometilación ha sido discutido anteriormente [44, 127] y en este contexto, los datos obtenidos en el presente trabajo son relevantes; con creciente concentración de Se(IV) aumentó la cantidad de los compuestos fenólicos que contienen grupos

metilo en su estructura y al mismo tiempo se detectó la tendencia decreciente en la metilación global del DNA. Estas observaciones sugieren cierta competencia por la metilación entre la ruta de síntesis de compuestos fenólicos y la metilación del DNA en presencia de selenio. Es importante hacer notar que la relación inversa entre compuestos fenólicos y niveles de metilación del DNA en plantas ha sido reportada en estudios anteriores [128]. Dicho efecto fue estudiado para compuestos fenólicos aislados de la planta de café, observándose un incremento de los niveles de S-adenosil-L-homocisteína que es un inhibidor de la metilación del DNA [129] (estudio *in vitro* con DNA sintético). Se conoce que el selenio puede sustituir al azufre en la metionina y sus respectivas rutas biológicas, de tal manera, que en varios tipos de organismos se han encontrado análogos de SAH y SAM que contienen selenio (SeAH y SeAM, respectivamente). Se ha sugerido que dicha sustitución podría afectar procesos de biometilación, incluyendo la metilación del DNA [44, 127], lo que parece una interesante idea para un posible estudio más detallado.

7. Finalmente, parece relevante que la creciente concentración de Se(IV) en el medio fue relacionada con el aumento de ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico, que contienen en su estructura varios grupos hidroxilo. Cabe mencionar que uno de los mecanismos de desmetilación del DNA descrito en mamíferos es iniciado por la oxidación de 5mdC, formando 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC) [130]. Aunque esta ruta, controlada por proteínas Tet (*ten-eleven translocation*), no ha sido encontrada en plantas, algunos estudios apuntan a la posible hidroxilación de citosinas metiladas en estos organismos [131, 132]. En vista de la disminución de la metilación del DNA en presencia de concentraciones elevadas de Se(IV), su posible efecto sobre los procesos de hidroxilación merece atención en un estudio futuro.

IV.2.5 Conclusiones

Es evidente que las NPSe sintetizadas en el laboratorio presentaron menor toxicidad en *L. sativum* con respecto al Se(IV); sin embargo, este efecto debe adscribirse al tamaño relativamente grande de las nanopartículas (diámetro aprox. 130 nm) y por ello su baja biodisponibilidad a la planta. Aún con esta limitación, los resultados obtenidos por GC-FID indican cambios en el perfil de compuestos fenólicos en plantas tratadas con ambas formas de selenio (Se(IV) y NPSe).

En el análisis de medios gastados y de fracciones de biomasa de plantas expuestas a Se(IV) se

encontraron cambios de concentraciones de más de 10 compuestos fenólicos, así como la tendencia del decremento de la metilación global del DNA. Los resultados de los análisis PCA y de correlación permitieron hallar una serie de asociaciones entre las condiciones de exposición y los niveles de compuestos fenólicos, principalmente de la ruta del ácido shikímico. Con base en estos análisis se propuso que el Se(IV) activa la defensa de la planta mediante la síntesis y la exudación de compuestos fenólicos (ácido benzoico y sus derivados). Asimismo, los resultados obtenidos sugieren que el Se(IV) podría activar cierta competencia entre los ácidos fenólicos y el DNA por la metilación así como provocar hidroxilación oxidativa de compuestos fenólicos y del DNA.

IV.3 Desarrollo de un procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-ITMS y su aplicación al análisis de muestras reales derivadas de plantas

IV.3.1 Introducción

Los resultados que se presentaron en la sección anterior confirmaron una vez más la importancia del análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos en material de plantas. Es por ello, que la siguiente parte del proyecto se enfocó en el desarrollo de un nuevo procedimiento para la determinación de 34 compuestos de este grupo (en esta búsqueda se contó con tres estándares más que en el estudio de la sección anterior, es el caso de los ácidos: 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilpropanoico y 4-metoxicinámico), basado en la separación por cromatografía de líquidos en fase inversa y detección por espectrometría de masas. A pesar de que la espectrometría de masas ha ganado terreno en este tipo de análisis, en la gran mayoría de los estudios recientes se usaron detectores de alta resolución que además permiten la fragmentación de iones (MS/MS) para la identificación/confirmación de los compuestos individuales, mientras que la detección espectrofotométrica con arreglo de diodos (DAD) se sigue usando preferentemente para la cuantificación de ácidos fenólicos de baja masa molecular [133-138]. Debido a la falta de selectividad, la detección UV obliga a largas corridas cromatográficas de hasta 80 minutos lo que es una limitante importante cuando se necesitan análisis de largas series de muestras [137, 139, 140]. Por otra parte, los detectores de masas de tipo trampa iónica aunque de baja resolución, ofrecen ventajas de bajo costo, versatilidad y posibilidad de múltiples fragmentaciones de iones. En concreto, para fines cuantitativos la trampa iónica es particularmente útil en las modalidades de monitoreo selectivo de iones (SIM), los cromatogramas de iones extraídos (EIC) o el monitoreo de reacciones múltiples (MRM) [141-143].

Con base en estos antecedentes, se propuso utilizar la ionización por electronebulización y el detector másico de trampa iónica empleando para la cuantificación de los cromatogramas extraídos de iones correspondientes a los compuestos fenólicos individuales. A continuación se presenta el desarrollo y validación del procedimiento así como a manera de ejemplo, su aplicación en el análisis de compuestos fenólicos en tequila. En un estudio posterior, el mismo procedimiento demostró su utilidad en la evaluación del efecto que tiene la liberación de compuestos fenólicos

por las células somáticas de la planta de café sobre la disminución del grado de metilación del DNA en estas células [144].

IV.3.2 Objetivo

Desarrollar un procedimiento analítico para la determinación de 34 compuestos fenólicos de baja masa molecular (110-354 Da) utilizando cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada mediante el dispositivo de electroionización a un espectrómetro de masas de trampa iónica, así como demostrar la versatilidad de dicho procedimiento por vía de su aplicación en el análisis de muestras que contienen metabolitos de plantas. De manera concreta, se analizaron tequilas con diferente grado de maduración y de exudados de plantas en etapa de embriogénesis somática.

IV.3.3 Condiciones Experimentales

Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un compartimiento de columna con termostato y automuestreador acoplado en línea con una trampa iónica (AmaZon SL) equipada con una fuente de ionización por electronebulización (Bruker Daltonics). El sistema LC-MS fue controlado por el software *Hystar V3.2*, los datos fueron procesados por *Data Analysis V4.1 SP2* y *QuantAnalysis V2.0 SP2* (Bruker Daltonics). La columna cromatográfica fue una columna Luna C18 (150 x 2 mm, 3 μ m) de Phenomenex.

Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron grado analítico (Sigma-Aldrich). Acetonitrilo grado HPLC, etanol (Fisher Scientific), y agua desionizada (18.2 M Ω cm⁻¹, Labconco, USA). El ácido fórmico y formiato de amonio fueron de Sigma.

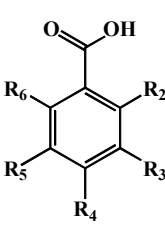
Se utilizaron los siguientes compuestos fenólicos (Sigma): ácido gálico (1); ácido homogentísico (2); ácido protocatecuico (3); ácido 3,4-dihidroxifenilacetico (4); ácido clorogénico (5); catequina (6); resorcinol (7); ácido 2,5-dihidroxibenzoico (8); ácido 4-hidroxibenzoico (9); epicatequina (10); ácido 2,3-dihidroxibenzoico (11); ácido cafeico (12); catecol (13) ácido vanílico

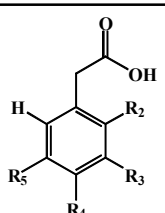
(14); ácido siríngico (15); ácido 2,4-dihidroxibenzoico (16); ácido homovanílico (17); ácido 3-hidroxibenzoico (18); ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (19); ácido 3,4-dihidroxifenilpropionico (20); ácido 2,6-dihidroxibenzoico (21); ácido *p*-cumárico (22); ácido sinápico (23); ácido ferúlico (24); ácido 3,4-dimetoxibenzoico (25); ácido *m*-cumárico (26); ácido *o*-anísico (27); ácido *t*-2-hidroxicinámico (28); ácido salicílico (29); ácido benzoico (30); ácido cinámico (31); ácido 4-metoxicinámico (32); cafeína (33); cumarina (34). Sus estructuras se muestran en la Figura 4.29.

El tequila comercial 100% de agave de diferentes marcas fue obtenido de tiendas locales. En total, 22 tequilas fueron analizados de los cuales seis eran blancos (B1-B6), 12 reposados (R1-R12), y 4 añejos (A1-A4).

Para la calibración, se utilizaron mezclas de estándares con la siguiente concentración: 0; 0.05; 0.10; 0.50; 1.0; 2.0; y 2.5 mg L⁻¹, las cuales fueron preparadas en etanol al 40% v/v, mientras que las muestras de tequila fueron diluidas 1:3 con fase móvil A. Para los experimentos de recuperación, se agregó 1 mL de la mezcla de estándares que contenía 0.45 mg L⁻¹ a 1 mL de tequila reposado (R2) y se llevó a 3 mL con fase móvil A (de esta manera se incrementó la concentración en 0.15 mg L⁻¹ para cada compuesto). Todas las soluciones fueron filtradas (filtros Whatman PVDF de 0.22 µm), el volumen de inyección fue de 10 µL y se realizaron corridas por triplicado. El gradiente de elución, se llevó a cabo con 2 fases móviles (A- formiato de amonio 10 mM + 0.2% v/v de ácido fórmico, pH 2.9; B-acetonitrilo + 0.2% v/v ácido fórmico) con el gradiente siguiente: 0-1 min 15% B; 1-6 min 50% B; 6-8 min 60% B; 11-13 min 90% B; 14-17 min 15% B; la columna se mantuvo a 30 °C y el flujo se fijó en 0.25 mL min⁻¹.

La fuente de electroionización se operó con los siguientes parámetros: voltaje de electrospray alternado en 4500 V; voltaje de plato 500 V; presión del nebulizador 26 psi (N₂); gas de secado 6 L min⁻¹ (N₂); temperatura de fuente 200 °C y el voltaje de la salida del capilar 140 V. Los espectros de masas se adquirieron en modo de operación “UltraScan” para un rango *m/z* 70-400, con un control de carga de iones (ICC) ajustado a 100,000 con tiempo máximo de acumulación de 100 ms. La puesta a punto de los parámetros se ajustó para una mezcla que contenía estándares de los 34 compuestos (0.1 mg L⁻¹ de cada uno) usando ajuste de parámetros inteligente (SPS) para una *m/z* de 200. Se adquirieron cromatogramas de iones totales de los que se generaron cromatogramas de pico base y de iones extraídos (BPC y EIC respectivamente). El software utilizado para la cuantificación de los resultados fue Bruker QuantAnalysis, calculando las áreas de pico de los iones (M-H)⁻¹ y (M+H)⁺ para ESI negativo y positivo respectivamente.

Estructura	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Número
	H	OH	OH	OH	H	ácido gálico	1
	H	OH	OH	H	H	ácido protocatecuico	3
	OH	H	H	OH	H	ácido 2,5-dihidroxibenzoico	8
	H	H	OH	H	H	ácido 4-hidroxibenzoico	9
	OH	OH	H	H	H	ácido 2,3-dihidroxibenzoico	11
	H	OCH ₃	OH	H	H	ácido vanílico	14
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	ácido siringico	15
	OH	H	OH	H	H	ácido 2,4-dihidroxibenzoico	16
	H	OH	H	H	H	ácido 3-hidroxibenzoico	18
	OH	H	H	H	OH	ácido 2,6-dihidroxibenzoico	21
	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	ácido 3,4-dimetoxibenzoico	25
	H	OCH ₃	H	H	H	ácido <i>o</i> -anísico	27
	OH	H	H	H	H	ácido salicílico	29
H	H	H	H	H	ácido benzoico	30	

Estructura	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre	Número
	OH	H	H	OH	ácido homogentísico	2
	H	OH	OH	H	ácido 3,4-dihidroxifenilacetico	4
	H	OCH ₃	OH	H	ácido homovanílico	17

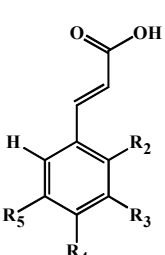
Estructura	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre	Número
	H	OH	OH	H	ácido cafeico	12
	H	H	OH	H	ácido <i>p</i> -cumárico	22
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	ácido sinápico	23
	H	OCH ₃	OH	H	ácido ferúlico	24
	H	OH	H	H	<i>m</i> -cumárico	26
	OH	H	H	H	ácido <i>t</i> -2-hidroxicinámico	28
	H	H	H	H	ácido cinámico	31
	H	H	OCH ₃	H	ácido 4-metoxicinámico	32

Figura 4.29 Estructura de los compuestos fenólicos analizados

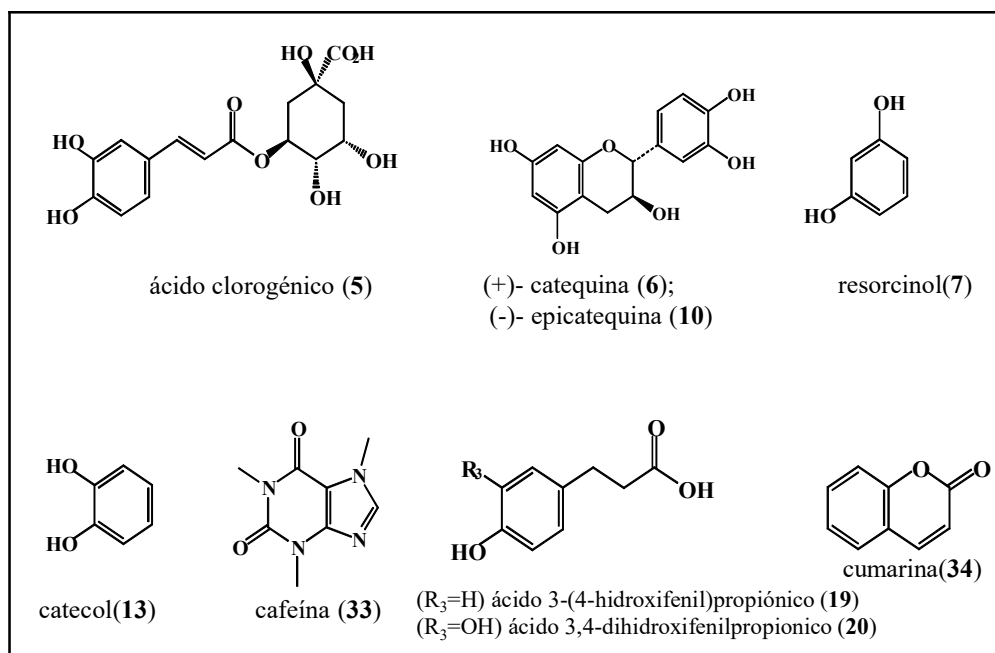


Figura 4.29–Continuación, estructura de los compuestos fenólicos analizados

IV.3.4 Resultados y discusión

IV.3.4.1 Puesta a punto del procedimiento

Las masas moleculares de los 34 compuestos aquí incluidos están el rango de 110-354 Da, y algunos de ellos presentan la misma masa nominal como es el caso 110 Da para resorcinol (7) y catecol (13); 138 Da para los isómeros de los ácidos hidroxibenzoicos (9, 18, 29); 154 Da para ácido protocatecuico (3) e isómeros de ácido dihidroxibenzoico (8,11,16,21); 164 Da para ácido *p*-cumárico (22), ácido *m*-cumárico (26) y ácido *t*-2-hidroxicinámico (28); 168 Da para ácido homogentísico (2), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (4), y ácido vanílico (14); 182 Da para ácido homovanílico (17), 3,4-dihidroxifenilpropiónico (20) y ácido 3,4-dimetoxibenzoico (25); 290 Da para catequina y epicatequina (Tabla 4.11). La separación cromatográfica de estos compuestos tiene que ser asegurada para compensar la baja resolución de los equipos de ITMS. Para este propósito, la retención para cada uno de los compuestos fue estudiada variando la concentración del buffer de formiato (1-20 mM de formiato de amonio), el pH (2.5-4), así como el gradiente de acetonitrilo como modificador orgánico. Los tiempos de retención con sus respectivas

desviaciones estándar y los valores de m/z usados para la los EIC se muestran en la Tabla 4.11. La Figura 4.30 muestra los cromatogramas de iones extraídos para una mezcla de soluciones estándar que contenía 0.5 mg L^{-1} de cada compuesto. En la Figura 4.31, se muestran cromatogramas sobrepuestos para 1.0 y 2.5 mg L^{-1} . Se obtuvieron las regresiones lineales ($R > 0.997$ para todos los compuestos) y los límites de detección y cuantificación (DL, QL) fueron evaluados en base a la relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10 desviaciones estándar respectivamente. Para cada analito, la señal fue obtenida del punto más bajo de la curva de calibración, y el ruido fue evaluado de la línea base del blanco en la región del cromatograma en la que eluye cada compuesto. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.11 y los parámetros de regresión lineal en la Tabla 4.12.

En el caso de soluciones estándar disueltas en etanol al 40 % v/v , la separación de los 34 estándares se realizó en 11 minutos con tiempos de retención considerablemente reproducibles (Figura 4.30 y 4.31), sin embargo, para muestras reales con matrices más complejas estos tiempos de retención no fueron reproducibles en inyecciones sucesivas complicando la cuantificación de los analitos. Para evitar este problema, se optó por un incremento en el gradiente de acetonitrilo (60-90% de B) durante dos minutos más eliminando de esta manera los componentes de la muestra remanentes en la columna, en seguida fue necesario reequilibrar con 15 % de B durante 4 minutos. De esta manera, en una corrida de 17 minutos, los tiempos de retención para los compuestos presentes en los tequilas fueron altamente reproducibles y consistentes con aquellos obtenidos en las soluciones de calibración. (Tablas 4.10 y 4.12, Figura 4.32). En la Figura 4.32, se presentan los EIC seleccionados para el tequila R2 antes y después de la adición de estándares. Los resultados de la cuantificación y recuperación evaluados en este experimento se presentan en la Tabla 4.13. Como se puede observar, los porcentajes de recuperación para cada compuesto están en el rango de 74-118% confirmando la validez del procedimiento propuesto para el análisis cuantitativo en muestras de tequila.

En resumen, la identidad de los compuestos presentes en el tequila fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención de los EIC con los obtenidos para los estándares así como mediante el método de adición de estándar; los compuestos individuales fueron cuantificados mediante la ecuación de regresión lineal.

Tabla 4.11 Masas moleculares, m/z usados para los cromatogramas de iones extraídos, tiempos de retención y límites de detección/cuantificación evaluados para 34 compuestos fenólicos basados en la calibración de regresión lineal.

Compuesto fenólico		MM, Da	EIC m/z	T_{ret} , min (RSD, %) ^a	DL ^b , $\mu\text{g L}^{-1}$	QL ^c , $\mu\text{g L}^{-1}$
ESI negativo						
1	Ácido gálico	170.0	169	2.25 (0.91)	2.35	7.83
2	Ácido homogentísico	168.0	167	2.55 (0.48)	2.66	8.87
3	Ácido protocatecuico	154.0	153	3.10 (0.47)	2.56	8.53
4	Ácido 3,4-dihidroxifenilacetico	168.0	167	3.30 (0.67)	11.1	37.1
5	Ácido clorogénico	354.1	353	3.40 (0.69)	2.57	8.57
6	Catequina	290.1	289	3.90 (0.62)	2.80	9.33
7	Resorcinol	110.0	109	4.20 (0.45)	67.0	223
8	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	154.0	153	4.20 (0.48)	7.79	26.0
9	Ácido 4-hidroxibenzoico	138.0	137	4.85 (0.22)	10.9	36.4
10	Epicatequina	290.1	289	5.15 (0.33)	3.22	10.7
11	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	154.0	153	5.10 (0.26)	5.83	19.4
12	Ácido cafeico	180.0	179	5.30 (0.25)	3.00	10.0
13	Catecol	110.0	109	5.35 (0.26)	17.9	59.7
14	Ácido vanílico	168.0	167	5.35 (0.22)	19.1	63.5
15	Ácido siríngico	198.1	197	5.40 (0.25)	10.0	33.5
16	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	154.0	153	5.40 (0.24)	1.96	6.53
17	Ácido homovanílico	182.1	181	5.55 (0.21)	8.17	27.2
18	Ácido 3-hidroxibenzoico	138.0	137	5.85 (0.10)	9.65	32.2
19	Ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico	166.1	165	6.40 (0.02)	2.85	9.50
20	Ácido 3,4-dihidroxifenilpropionico	182.1	181	6.60 (0.01)	10.3	34.4
21	Ácido 2,6-dihidroxibenzoico	154.0	153	6.55 (0.07)	2.34	7.80
22	Ácido p-cumárico	164.0	163	6.70 (0.02)	4.86	16.2
23	Ácido sinápico	224.1	223	6.90 (0.04)	2.34	7.80
24	Ácido ferúlico	194.1	193	7.00 (0.02)	1.81	6.03
25	Ácido 3,4-dimetoxibenzoico	182.1	181	7.25 (0.01)	25.6	85.5
26	Ácido m-cumárico	164.0	163	7.27 (0.02)	1.28	4.27
27	Ácido o-anísico	152.0	151	7.30 (0.02)	75.0	250
28	Ácido <i>t</i> -2-hidroxicinámico	164.0	163	7.80 (0.01)	2.67	8.90
29	Ácido salicílico	138.0	137	7.90 (0.02)	9.24	30.8
30	Ácido benzoico	122.0	121	8.00 (0.14)	56.4	188
31	Ácido cinámico	148.1	147	9.22 (0.12)	28.0	93.3
32	Ácido 4-metoxicinámico	178.1	177	9.21 (0.03)	24.9	83.1
ESI positivo						
27	Ácido o-anísico	152.0	153	7.30 (0.02)	4.29	14.3
33	Cafeína	194.1	195	3.90 (0.78)	5.54	18.5
34	Cumarina	146.0	145	8.80 (0.04)	28.0	93.3

a Desviación estándar relativa basada en 10 inyecciones sucesivas de la mezcla de estándares

b Límite de detección evaluado con S/N 3:1

c Límite de cuantificación evaluado con S/N 10:1

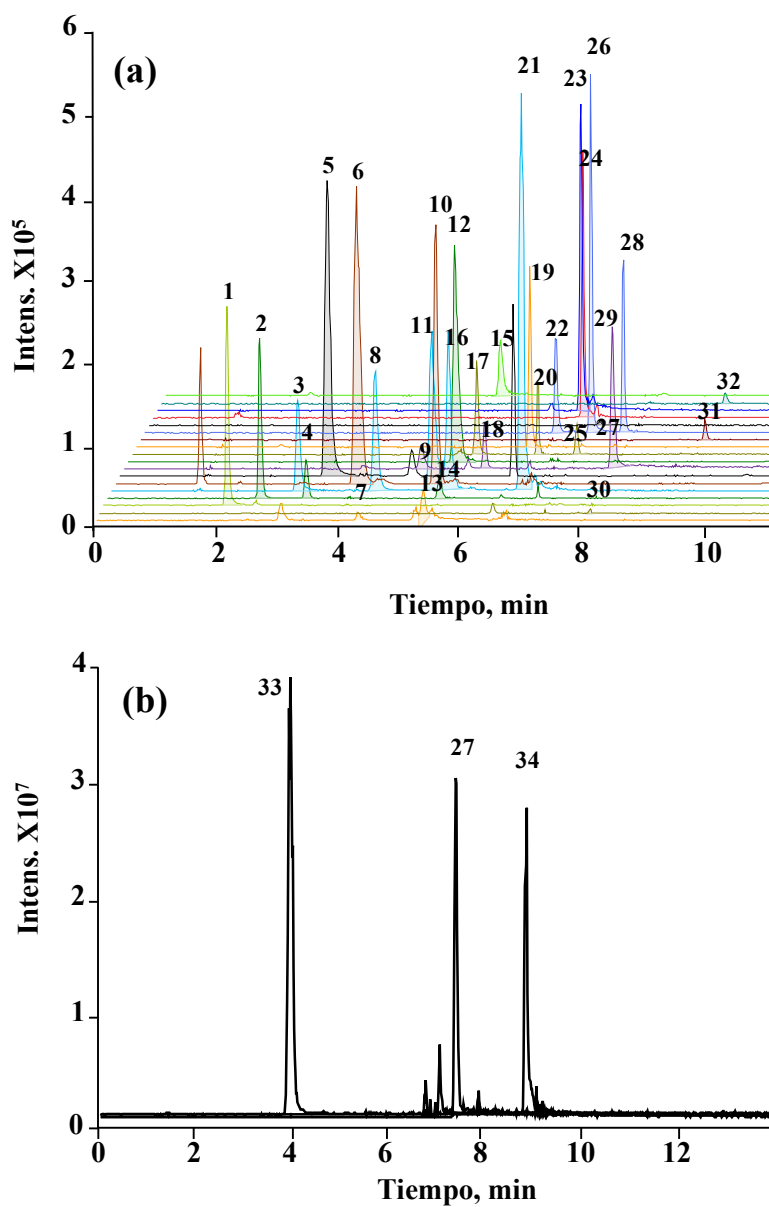


Figura 4.30 Cromatograma de iones extraídos (EIC) para una solución de calibración con 34 compuestos fenólicos (0.5 mg L^{-1} cada uno), el nombre de cada compuesto numerado se muestra en la Figura 4.29. **a)**- modo ESI(-), valores m/z 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177 y 197. **b)**- modo ESI(+), valores m/z 195, 151 y 147.

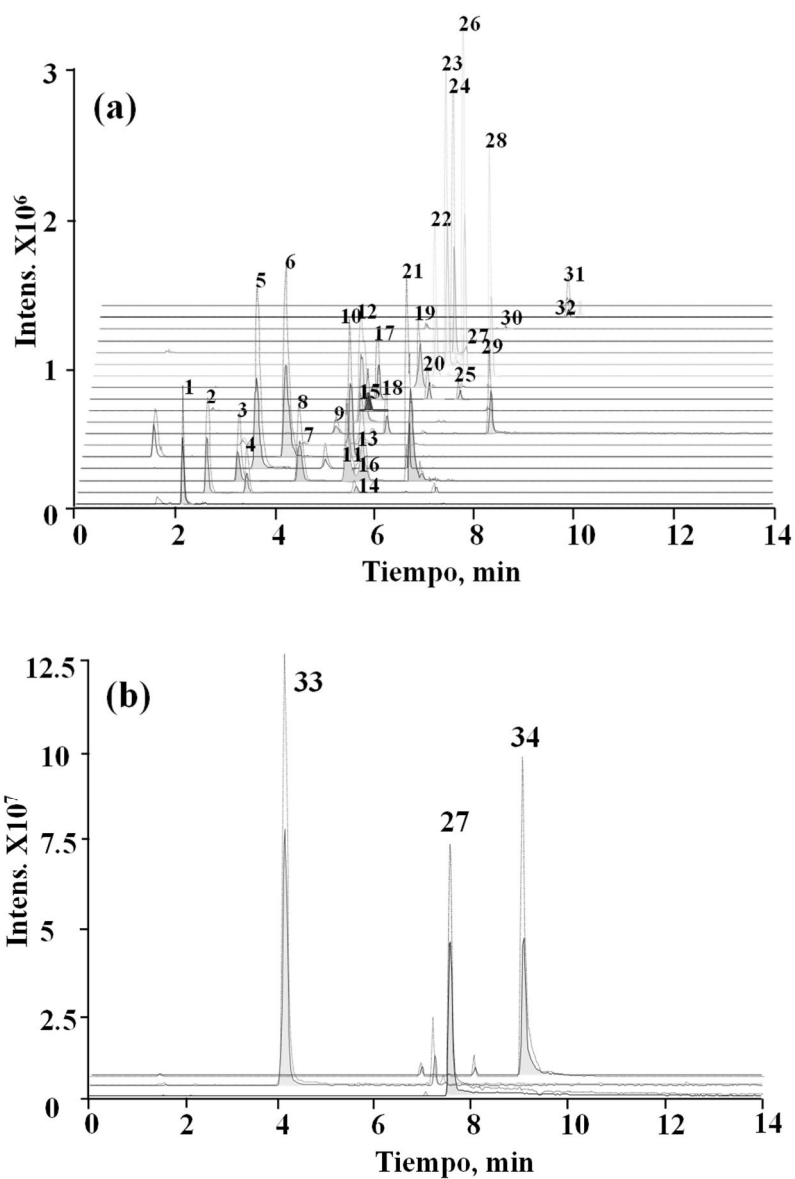


Figura 4.31 Cromatograma de iones extraídos para una solución de calibración con 34 compuestos fenólicos en dos niveles de concentración: 1.0 y 2.5 mg L⁻¹ línea sólida y semicontinua respectivamente. El nombre y estructura de cada compuesto numerado se muestra en la Figura 4.29. **a)**- modo ES(-), valores *m/z* 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177 y 197. **b)**- modo ESI(+), valores *m/z* 195, 151 y 147.

Tabla 4.12 Parámetros analíticos de los 34 compuestos fenólicos analizados utilizando el procedimiento HPLC-ESI-ITMS.

Analito	Función de regresión lineal ^a	R	RSD pendiente ^b	LD ^d , pmol	LQ ^e , pmol	CV ^f , %
ESI negativo						
1	$A = (3.233c + 0.135)10^6$	0.9918	2.2	0.14	0.45	2.3
2	$A = (1.198c - 0.046)10^6$	0.9985	7.4	0.16	0.54	3.5
3	$A = (1.502c + 0.022)10^6$	0.9991	0.4	0.17	0.56	1.2
4	$A = (0.321c - 0.010)10^6$	0.9988	5.1	0.66	2.20	1.9
5	$A = (11.16c + 0.140)10^6$	0.9980	3.9	0.07	0.25	0.9
6	$A = (5.836c + 0.023)10^6$	0.9998	0.9	0.11	0.32	2.7
7	$A = (0.128c + 0.135)10^6$	0.9976	0.3	6.09	20.3	3.9
8	$A = (2.180c + 0.101)10^6$	0.9991	3.8	0.51	1.69	3.2
9	$A = (0.563c + 0.001)10^6$	0.9993	6.5	0.79	2.63	2.8
10	$A = (3.651c + 0.161)10^6$	0.9977	1.4	0.11	0.37	3.1
11	$A = (6.320c + 0.131)10^6$	0.9973	2.5	0.38	1.25	2.8
12	$A = (5.702c + 0.009)10^6$	0.9986	5.6	0.17	0.56	3.3
13	$A = (0.674c + 0.054)10^6$	0.9999	4.4	1.63	5.43	4.7
14	$A = (0.259c - 0.001)10^6$	0.9997	3.4	1.14	3.79	5.2
15	$A = (0.572c + 0.003)10^6$	0.9989	0.7	0.50	1.68	2.6
16	$A = (2.756c + 0.017)10^6$	0.9997	2.4	0.13	0.44	2.4
17	$A = (0.179c - 0.001)10^6$	0.9987	6.1	0.45	1.50	5.1
18	$A = (0.437c + 0.009)10^6$	0.9993	5.9	0.71	2.34	4.2
19	$A = (1.148c + 0.067)10^6$	0.9979	6.0	0.17	0.56	3.2
20	$A = (0.661c + 0.001)10^6$	0.9999	7.3	0.57	1.88	5.0
21	$A = (6.517c + 0.380)10^6$	0.9953	1.5	0.15	0.50	1.9
22	$A = (1.438c + 0.123)10^6$	0.9937	2.7	0.30	0.99	1.7
23	$A = (2.655c + 0.021)10^6$	0.9994	3.1	0.10	0.34	1.1
24	$A = (1.648c + 0.019)10^6$	0.9994	2.4	0.09	0.31	2.4
25	$A = (0.305c + 0.008)10^6$	0.9982	2.5	1.41	4.68	4.8
26	$A = (3.088c - 0.047)10^6$	0.9997	5.8	0.08	0.26	1.9
27	$A = (0.720c + 0.051)10^6$	0.9975	0.4	4.93	16.5	4.2
28	$A = (1.200c - 0.022)10^6$	0.9993	1.0	0.16	0.55	3.2
29	$A = (2.239c + 0.097)10^6$	0.9942	2.3	0.67	2.22	1.1
30	$A = (0.479c + 0.001)10^6$	0.9991	3.7	4.62	15.4	4.1
31	$A = (0.248c + 0.004)10^6$	0.9747	1.1	1.89	6.30	7.2
32	$A = (0.190c + 0.011)10^6$	0.9903	0.8	1.40	4.66	8.1
ESI positivo						
27	$A = (2.724c + 0.118)10^8$	0.9911	2.7	0.28	0.94	1.3
33	$A = (0.961c + 0.011)10^8$	0.99436	0.4	0.28	0.94	2.1
34	$A = (0.250c - 0.001)10^8$	0.99865	3.4	19.2	6.39	1.0

a- A-Área de pico, c- $\mu\text{g L}^{-1}$

b- Desviación estándar relativa de la pendiente evaluada para tres réplicas de calibración evaluadas en diferentes días

d- Límite de detección en columna (pmol) evaluado en base a S/N 3:1

e- Límite de detección en columna (pmol) evaluado en base a S/N 10:1

f.- Coeficiente de varianza evaluado en cinco replicas sucesivas del estándar de calibración (0.1 mg L^{-1})

IV.3.4.2 Aplicación en el análisis de tequilas

De acuerdo con el objetivo de demostrar la aplicación del procedimiento, se analizaron tequilas de diferente grado de maduración. Gracias a su composición química relativamente simple, las muestras de tequila no requerían un extensivo tratamiento (solamente una dilución).

El tequila es elaborado de las plantas de *Agave Tequilana*. El proceso industrial es regulado por la norma oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994. De manera resumida, las piñas de la planta son cocidas para hidrolizar sus polisacáridos (principalmente inulina), en seguida se extraen los azúcares para ser fermentados. El producto de la fermentación es destilado obteniéndose de este el tequila blanco; a partir de este se obtienen los tequilas reposados y añejos mediante su almacenamiento por un periodo comprendido entre 2 y 12 meses en barriles de roble (la calidad del tequila está relacionada con mayor tiempo de almacenamiento en los barriles). Finalmente el tequila es filtrado y embotellado [145]. En varios estudios, la composición química del tequila se ha analizado con un énfasis en el control de la calidad, la autenticación, la discriminación entre tequilas 100% y mixto, adulteración o posible mejora del proceso de elaboración. En este sentido, se ha informado de la determinación de compuestos volátiles, aldehídos, alcoholes, ácidos orgánicos, compuestos furánicos, terpenos, aniones inorgánicos y metales/metaloides [146-151]; sin embargo la información de su contenido de compuestos fenólicos es muy escasa [148].

Diversos tipos de compuestos fenólicos tales como flavonoides, taninos, saponinas o lignanos han sido reportados en plantas del género del agave [152-154], sin embargo, en *Agave Tequilana* solo se han reportado homoisoflavonoides [155]. Cabe mencionar, que a lo largo del proceso químico, térmico y microbiológico que sufre el tequila durante su elaboración, el perfil original de los compuestos fenólicos del agave es modificado y las estructuras grandes suelen degradarse, algunos compuestos se pierden y/o se alteran en su estructura química [145, 156]. Por otro lado, una fuente importante de compuestos fenólicos de baja masa molecular en el tequila es su maduración en barriles de madera [157, 158]. En este sentido, los ácidos gálico, protocatecuico, vinílico, siríngico y ferúlico han sido estudiados como potenciales marcadores de añejamiento [148].

Como se mencionó anteriormente, solo cinco compuestos fenólicos de baja masa molecular se habían identificado previamente [148]. El procedimiento desarrollado en este trabajo permitió la búsqueda de 34 compuestos comúnmente reportados en análisis de productos derivados plantas.

Los resultados obtenidos indican que la principal fuente de compuestos fenólicos de baja masa molecular proviene de su maduración en los barriles de madera, sin embargo algunos de estos compuestos pueden tener origen en la materia prima de elaboración o formados a lo largo del proceso de producción del tequila.

Dentro de los 34 compuestos fenólicos incluidos en este estudio, los siguientes fueron encontrados y cuantificados en los tequilas: ácido gálico (1), ácido protocatecuico (3), ácido 4-hidroxibenzoico (9), ácido vanílico (14), ácido siríngico (15), ácido homovanílico (17), ácido 3-hidroxibenzoico (18), ácido ferúlico (24), ácido salicílico (29), y ácido benzoico (30). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.14 y en la Tabla 4.15 se muestran los resultados de cada muestra individual. En la Figura 4.33, se comparan los cromatogramas para tequilas blancos, reposados y añejos de la misma marca, donde se aprecia que los perfiles de compuestos fenólicos son considerablemente diferentes dependiendo de las condiciones de añejamiento.

Para las muestras de tequila blanco (B1-B6), el total de las concentraciones de los compuestos fenólicos aquí estudiados fueron menores con respecto a los añejos como se indica en la Tabla 4.14 de acuerdo a los valores de la mediana de $118 \mu\text{g L}^{-1}$ y las concentraciones en el rango de $36\text{-}408 \mu\text{g L}^{-1}$. En los tequilas sin reposar, el ácido homovanílico (17) fue el compuesto más abundante (a excepción de B3); otros compuestos encontrados en tequila blanco fueron los ácidos: protocatecuico (B3), vanílico (B3), 3-hidroxibenzoico (B4, B5) y ferúlico (B3, B4) (Tabla 4.14 y 4.15). Todos los tequilas reposados contenían diez compuestos; en concentraciones relativamente altas se determinaron los ácidos siríngico (15) y vanílico (14); en menor concentración fueron determinados los ácidos protocatecuico (3), gálico (1), benzoico (30), homovanílico (17) y otros cuatro compuestos fueron presentes solo en pocas muestras (9, 18, 24 y 29, Tablas 4.13 y 4.14). Cabe señalar que se apreciaron importantes diferencias en el número y concentración de los compuestos presentes en los tequilas añejos R1-R12, lo que sugiere diferencias en los procesos de maduración o las condiciones de añejamiento utilizados por los diferentes fabricantes. La variedad de compuestos fenólicos en tequilas reposados fue mayor que en los añejos. En particular, el ácido 4-hidroxibenzoico (presente en R2 y R4), 3-hidroxibenzoico (R5, R7, R10, R11), y benzoico (R1, R2, R4, R9) fueron presentes en tequilas reposados, pero no se encontraron en ningún tequila añejo, este hecho llama a la necesidad de investigar la maduración del tequila en sus etapas tempranas. Por otro lado, cuatro compuestos fueron detectados en concentraciones relativamente altas en A1-A4 con respecto a los otros grupos en el siguiente orden decreciente: ácido siríngico

(15) > vanílico (14) > protocatecuico (3) > gálico (1). Los tequilas añejados también contienen trazas de ácido salicílico (29), sin embargo el ferúlico solo se encontró en la muestra A1 a una concentración relativamente baja. La prueba *t*-test indicó concentraciones estadísticamente mayores de compuestos fenólicos en A1-A4 con respecto de R1-R12 ($p < 0.0080$) así como mayor cantidad de los ácidos siríngico ($p < 0.0069$), vanílico ($p < 0.0486$), y protocatecuico ($p < 0.0404$).

Un resultado interesante en este trabajo fue la presencia de ácido homovanílico (17) en los tres tipos de tequilas (Tabla 4.14 y 4.15). Este hallazgo sugiere que este compuesto pudiera tener su origen en la planta de agave o bien formarse durante el proceso de elaboración de tequila. Cabe resaltar que este ácido fue determinado con su EIC para m/z 181 y fue separado cromatográficamente de los compuestos 20 al 25 cuyos iones presentan el mismo valor m/z (Tabla 4.11); el porcentaje de recuperación de este compuesto en R2 fue del 80% (Tabla 4.13, Figura 4.32), esta evidencia excluye la posibilidad de un falso positivo.

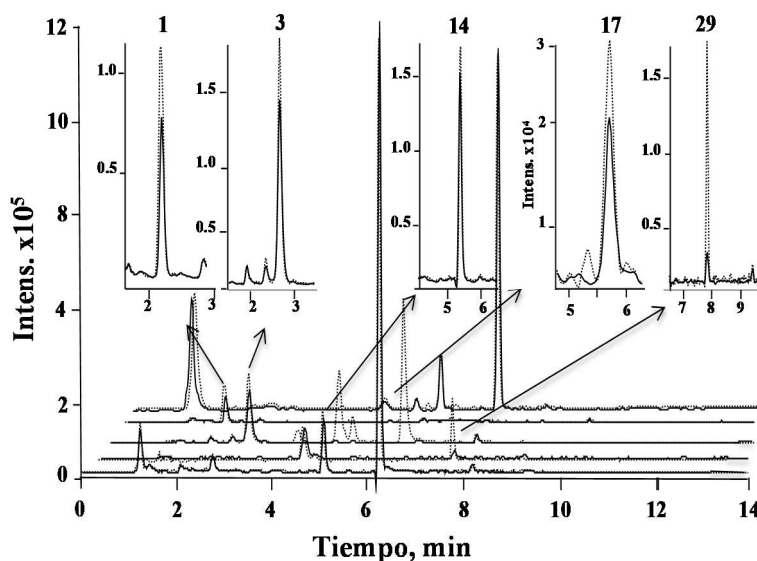


Figura 4.32 Cromatograma de iones extraídos seleccionados (m/z 167, 137, 153, 169, 181) obtenidos para un tequila reposado “R2” (línea sólida) y para la misma muestra después de la adición de estándares (línea semicontinua, 0.15 mg L^{-1} de cada compuesto).

Tabla 4.13 Experimento de recuperación (muestra R2, análisis por triplicado): tiempos de retención de los compuestos individuales, promedio de las concentraciones con sus respectivas desviaciones estándar obtenidas sin adición de estándar (no SA) y con adición de estándar (SA, 150 µg L⁻¹ de cada compuesto) y porcentajes de recuperación R.

Analito	T _{ret} (RSD) ^a min (%)	Promedio ± SD, µg L ⁻¹		R (%)	Analito	T _{ret} (RSD) ^a min (%)	Promedio ± SD, µg L ⁻¹		R (%)
		no SA	SA				no SA	SA	
ESI negativo									
1	2.21 (1.6)	116 ± 1	287 ± 8	114	17	5.65 (1.2)	175 ± 9	295 ± 7	80.0
2	2.57 (0.7)	77 ± 12	216 ± 19	92.7	18	5.85 (0.2)	nd	134 ± 12	89.3
3	3.11 (0.5)	679 ± 6	790 ± 21	74.0	19	6.40 (0.1)	nd	124 ± 24	82.7
4	3.32 (0.7)	Nd	173 ± 16	115	20	6.61 (0.2)	nd	143 ± 9	95.3
5	3.39 (0.7)	Nd	139 ± 14	92.7	21	6.54 (0.2)	nd	162 ± 8	108
6	3.91 (0.7)	Nd	141 ± 23	94.0	22	6.69 (0.2)	nd	172 ± 18	115
7	4.19 (0.6)	Nd	177 ± 18	118	23	6.89 (0.1)	nd	128 ± 19	85.3
8	4.20 (0.5)	Nd	140 ± 15	93.3	24	7.00 (0.1)	nd	151 ± 11	101
9	4.83 (1.1)	157 ± 2	289 ± 19	88.0	25	7.24 (0.1)	nd	173 ± 15	115
10	5.15 (0.6)	Nd	146 ± 11	97.3	26	7.27 (0.1)	nd	129 ± 10	86.0
11	5.12 (0.9)	Nd	141 ± 15	94.0	27	7.32 (0.2)	nd	131 ± 9	87.3
12	5.35 (0.9)	Nd	177 ± 12	118	28	7.80 (0.1)	nd	161 ± 7	107
13	5.36 (0.4)	Nd	167 ± 10	111	29	7.91 (1.0)	55 ± 3	201 ± 10	97.3
14	5.37 (0.2)	785 ± 24	961 ± 38	117	30	8.00 (0.1)	1036 ± 104	1148 ± 96	74.7
15	5.42 (0.9)	1290 ± 20	1430 ± 52	93.3	31	9.21 (0.2)	nd	148 ± 8	98.7
16	5.41 (0.3)	13.5 ± .11	166 ± 13	102	32	9.22 (0.1)	77 ± 12	219 ± 13	94.7
ESI positivo									
27	7.30 (0.1)	Nd	162 ± 12	108	34	8.80 (0.1)	nd	151 ± 8	101
33	3.91 (0.8)	Nd	151 ± 9	101					

a.-Tiempo de retención con su respectiva desviación estándar evaluada para cinco inyecciones sucesivas.

Tabla 4.14 Promedios y rangos de las concentraciones (µg L⁻¹) de compuestos fenólicos determinados en muestras de tequila mediante HPLC-ESI-ITMS

Compuestos fenólicos	Tequilas blancos (B1-B6)		Teq. reposados (R1-R12)		Tequila añejos (A1-A4)	
	mediana	rango	mediana	rango	mediana	rango
1	< DL	-	215	<DL-494	216	106-421
3	26	< QL-26	117	39-679	298	186-667
9	< DL	-	165	< DL-157	< DL	-
14	107	<DL-107	348	135-788	593	450-764
15	< DL	-	740	< DL-1290	1223	860-1890
17	82	< DL-301	153	27-330	162	< DL-191
18	81	< DL-107	96	< DL-102	< DL	-
24	35	< DL-49	55	< DL-55	32	< DL-32
29	< DL	-	47	< DL-55	47	< DL-49
30	< DL	-	696	< DL-1036	< DL	-
Fenólicos totales	118	36-408	1699	880-4296	2664	2048-3249

Tabla 4.15 Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados en tequilas blancos, reposados y añejos (B1-B6, R1-R12, A1-A4, respectivamente); los valores promedio de tres replicas se presentan en $\mu\text{g L}^{-1}$ y las celdas sin valor indican que el compuesto no se detectó.

Tequila	Compuestos presentes en el tequila; valores promedio \pm SD, $\mu\text{g L}^{-1}$										
	1	3	9	14	15	17	18	24	29	30	Σ
Tequilas blancos											
B1						39 \pm 2					39
B2		<QL				82 \pm 4					82
B3		26 \pm 2		107 \pm 9				21 \pm 1			154
B4		<QL				213 \pm 7	55 \pm 2	49 \pm 1			317
B5						301 \pm 6	107 \pm 3				408
B6						36 \pm 5					36
Tequilas reposados											
R1		39 \pm 3		236 \pm 11	390 \pm 12	27 \pm 2			47 \pm 1	935 \pm 45	1863
R2	116 \pm 11	679 \pm 12	157 \pm	788 \pm 14	1290 \pm 17	175 \pm 5			55 \pm 2	1036 \pm 37	4387
R3		82 \pm 3	<QL	760 \pm 12	940 \pm 21	36 \pm 3			<QL	175 \pm 21	2009
R4		213 \pm 10	172 \pm	467 \pm 12		96 \pm 4			<QL		1437
R5	142 \pm 8	129 \pm 11		325 \pm 9	596 \pm 24	330 \pm 10	102 \pm 2	55 \pm	44 \pm		1723
R6	494 \pm 13	188 \pm 12		429 \pm 13	1090 \pm 45	139 \pm 4			<QL		2340
R7		48 \pm 3		195 \pm 14	351 \pm 24	222 \pm 8	64 \pm 1				920
R8	287 \pm 13	77 \pm 4		326 \pm 17	707 \pm 17	109 \pm 4					1521
R9	417 \pm 12	158 \pm 8	<QL	369 \pm 21	773 \pm 13	166 \pm 11				457 \pm 15	2340
R10		144 \pm 10	<QL	458 \pm 18	875 \pm 15	274 \pm 12	95 \pm 3				1846
R11		89 \pm 7		136 \pm 14		194 \pm 7	96 \pm 3				515
R12	26 \pm 2	105 \pm 10		290 \pm 21	630 \pm 18	128 \pm 7			<QL		1179
Tequilas añejos											
A1	277 \pm 15	186 \pm 12		453 \pm 16	860 \pm 10	191 \pm 10		32 \pm 2	49 \pm 2		2127
A2	106 \pm 11	208 \pm 10		764 \pm 16	1890 \pm 28	<QL			<QL		2968
A3	421 \pm 12	667 \pm 16		732 \pm 15	1285 \pm 43	144 \pm 4			<QL		3249
A4	154 \pm 8	388 \pm 12		450 \pm 23	1161 \pm 25	162 \pm 5			45 \pm 3		2360

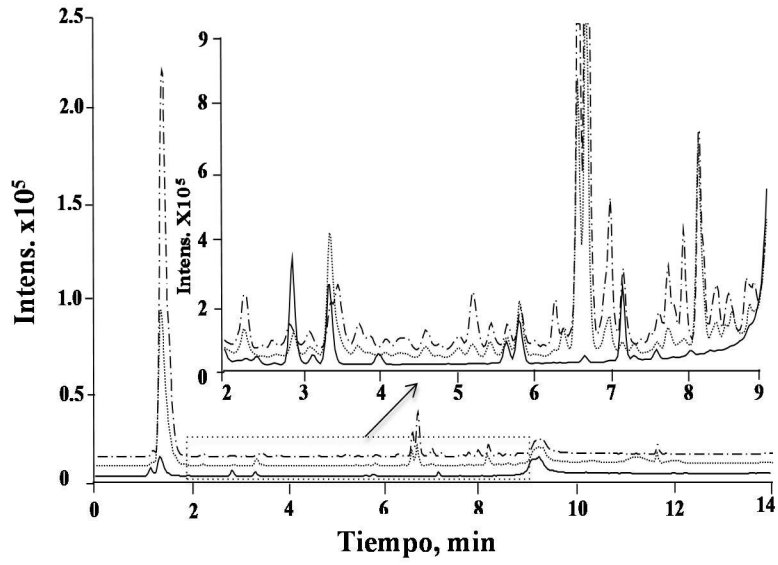


Figura 4.33 Cromatograma de pico base obtenidos para tequila blanco (línea sólida), reposado (línea punteada) y añejo (línea semicontinua) de la misma marca (muestras B4, R5 y A1, respectivamente).

IV.3.4.3 Aplicación en el análisis de exudados de plantas en etapa de embriogénesis somática

Una vez demostrado que el procedimiento HPLC-EST-ITMS propuesto en este trabajo permite la detección y cuantificación de hasta 34 compuestos fenólicos en la presencia de una matriz química derivada del material de plantas, se procedió con su aplicación en el análisis de muestras de plantas provenientes de la etapa de embriogénesis. Las muestras analizadas fueron obtenidas en un estudio realizado en *Coffea arabica* por el grupo de investigación del Dr. Víctor Manuel Loyola-Vargas. Cabe aclarar que la producción de una planta a partir de una célula somática es una evidencia clara de que las células contienen la información genética necesaria para desarrollar una planta completamente funcional [159], proceso conocido como embriogénesis somática (SE).

Uno de los factores que deciden sobre el éxito o fracaso de la SE es la presencia de moléculas orgánicas liberadas por los explantes (pequeños fragmentos de la planta) al medio de cultivo. Algunos metabolitos secundarios han sido asociados con la inhibición de este proceso [160]. El mecanismo molecular mediante el cual los metabolitos secundarios afectan la SE está asociado con la modulación epigenética [129, 161-163].

Se ha sugerido en numerosos estudios que la metilación del DNA es importante para el desarrollo de embriones somáticos [144, 164-166]. Se ha confirmado que existe una correlación negativa entre algunos compuestos fenólicos y los niveles de metilación del DNA [128]. Así mismo, se ha reportado que algunos de los factores químicos implicados en el deterioro de la SE son sustancias de baja masa molecular [160, 167].

Con base en estos antecedentes, el objetivo del estudio biológico fue evaluar compuestos fenólicos secretados por plantas de café *Coffea arabica* como posibles responsables de la represión de *Coffea canephora* durante su etapa de embriogénesis somática [144].

El análisis de compuestos fenólicos se llevó a cabo en la fracción de baja masa molecular del medio de inducción gastado (mCM; < 5kDa) [168]. Como resultado, se identificaron ocho compuestos fenólicos (Tabla 4.16) entre los 34 buscados (Tabla 4.11), los cuales se cuantificaron en dos experimentos diferentes (Figura 4.34). Entre los compuestos identificados los ácidos benzoico, ferúlico, salicílico y cafeico, así como la catequina y la epicatequina fueron encontrados en baja concentración, mientras que el ácido clorogénico y la cafeína representaron el 98% de los compuestos identificados (Tabla 4.16).

De los metabolitos identificados mediante HPLC-ESI-ITMS, Loyola-Vargas y col. estudiaron cuatro de estos (cafeína, ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico y *t*-cinámico) para evaluar la respuesta de *C. canephora* a estos compuestos durante el proceso de embriogénesis encontrando que la cafeína reprime fuertemente la SE aun en bajas concentraciones [144]. Los resultados obtenidos sugieren que las moléculas presentes en mCM estimulan directa o indirectamente la disminución del porcentaje de metilación del DNA.

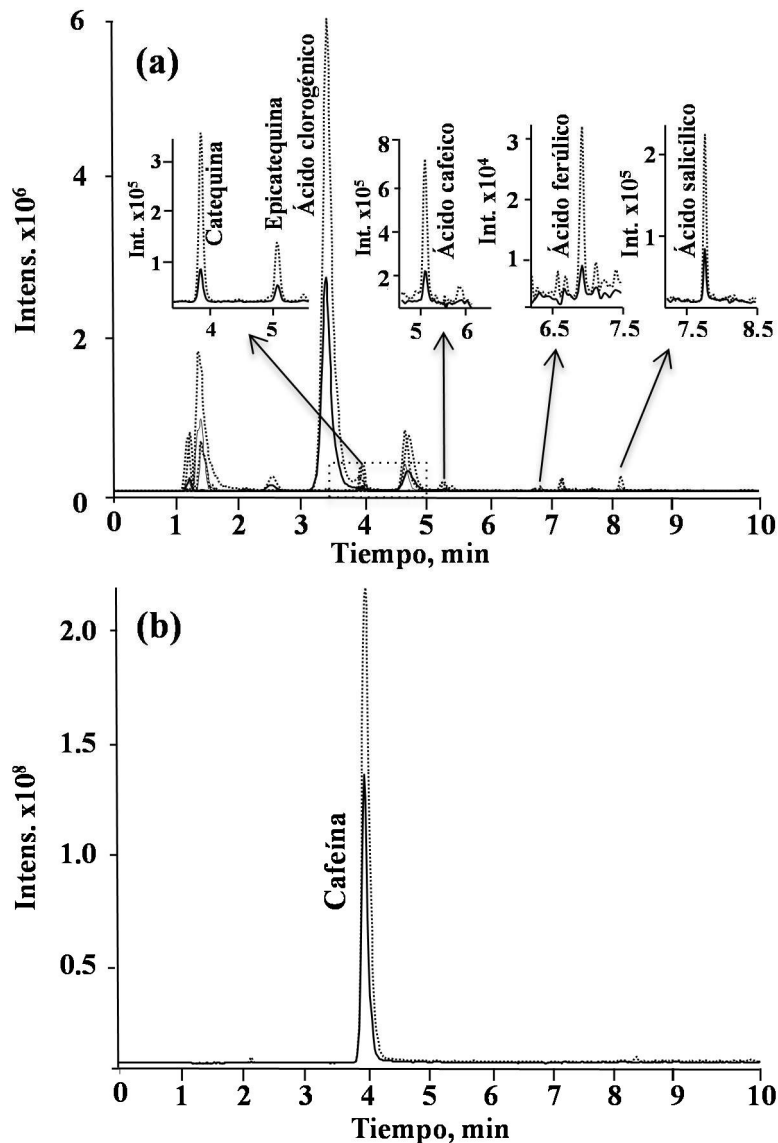


Figura 4.34 Cromatograma de iones extraídos seleccionados de compuestos fenólicos encontrados en mCM. a)- Compuestos detectados en ESI negativo. b)- Cafeína detectada en ESI positivo.

Tabla 4.16 Concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados en dos muestras independientes de mCM proveniente de *C. arábica* por HPLC-ESI-ITMS.

Compuesto fenólico	mCM1($\mu\text{moles matraz}^{-1}$)	mCM2($\mu\text{moles matraz}^{-1}$)
Ácido benzoico	0.260	0.390
Cafeína	11.04	10.98
Ácido cafeico	0.017	0.039
Catequina	0.034	0.087
Ácido clorogénico	1.715	1.986
Epicatequina	0.029	0.050
Ácido ferúlico	0.019	0.024
Ácido salicílico	0.186	0.275

IV.3.5 Conclusiones

Se desarrolló un procedimiento simple por cromatografía de líquidos acoplada mediante ionización por electronebulización al detector másico de trampa iónica (HPLC-ESI-ITMS) para la determinación de 34 compuestos fenólicos de baja masa molecular típicamente reportados en materiales de plantas, con límites de cuantificación instrumentales en el intervalo de 4.27-223 $\mu\text{g L}^{-1}$ en una corrida analítica de 17 minutos.

La preparación de la curva de calibración con un porcentaje de etanol similar al de la matriz de los tequilas mejoró la repetitividad de en los tiempo de retención.

En el análisis de 22 muestras de tequila, diez compuestos fueron cuantificados y seis más detectados por debajo de su límite de cuantificación. Los resultados obtenidos indican que la mayor cantidad de los compuestos fenólicos determinados se forman durante la etapa de maduración en barricas de madera; los ácidos siríngico, vanílico y protocatecuico junto con el contenido total de compuestos fenólicos pueden ser considerados como marcadores de añejamiento.

El procedimiento propuesto mostró su viabilidad en la determinación/cuantificación de compuestos fenólicos de baja masa molecular liberados al medio de inducción gastado durante la etapa de embriogénesis somática de *C. arábica*. En dicho medio se cuantificaron ocho compuestos de los 34 buscados.

El procedimiento HPLC-ESI-ITMS propuesto es simple y puede considerarse una alternativa conveniente para el análisis del perfil de compuestos fenólicos en productos variados, derivados de plantas.

IV.4 Desarrollo de un nuevo procedimiento analítico basado en el acoplamiento de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem para evaluación del grado de metilación global de ácidos nucleicos en *Lepidium sativum* expuesto a nanopartículas de óxido de cobre.

En la primera parte de esta sección, se plantea el desarrollo y aplicación de un procedimiento mediante de monitoreo reacciones múltiples con una y dos transiciones para evaluar el porcentaje de metilación global de DNA en plantas expuestas a nanopartículas de cobre (CuO NPs). Para este propósito, el *L. sativum* se creció hidropónicamente en presencia de nanopartículas de cobre, las cuales fueron seleccionadas debido a su uso extensivo así como por los efectos tóxicos del cobre relacionados con concentraciones no homeostáticas de este metal en organismos vivos. Cabe señalar que a pesar de que la biotransformación y toxicidad de nanopartículas ha sido estudiada en diferentes modelos de plantas, la información sobre la metilación de los ácidos nucleicos es escasa.

La segunda parte del presente trabajo, responde a la necesidad de contar con una estrategia relativamente simple, confiable y útil para la identificación de nucleósidos modificados en hidrolizados de ácidos nucleicos de plantas expuestas a nanopartículas (NPs), mediante el análisis por HPLC-ESI-MS/MS modo *full scan* (barrido completo). Dicha identificación se fundamenta en la información obtenida mediante el análisis de las pérdidas neutrales contantes (CNL) de 116 Da (desoxiribosa) característica de los nucleósidos provenientes del DNA así como la pérdida de 132 Da (ribosa) proveniente del RNA, los patrones de fragmentación MS/MS, la polaridad de las moléculas (en base a sus tiempos de retención), así como la revisión en reportes bibliográficos.

IV.4.1 Introducción

Los nanomateriales constituyen una invaluable ayuda para el hombre en incontables aplicaciones industriales, en la medicina y en la protección de plantas contra plagas. Al mismo tiempo, se está incrementando la exposición de los organismos vivos a estos productos de tamaño nanométricos lo que ha despertado preocupación sobre sus potenciales efectos adversos en los seres humanos [169, 170]. Las plantas son susceptibles a entrar en contacto con las nanopartículas; los estudios realizados se han enfocado en la absorción, translocación, solubilización/metabolización, interacción con biomoléculas así como su efecto sobre el estrés oxidativo [171-174]. El impacto de los nanomateriales en los eventos epigenéticos ha sido estudiado, sin embargo se ha resaltado

la necesidad de contar con datos confiables así como una mejor comprensión de los mecanismos que ocasionan los efectos observados [172, 175-178]. Este tema es de gran interés debido a que los cambios dinámicos en la metilación del DNA son considerados como una fuente de fenotipos heredables. A pesar de esto, la metilación global raramente ha sido evaluada en plantas expuestas a nanomateriales [179, 180].

Los cambios dinámicos de la metilación del DNA se rigen por los mecanismos de metilación y desmetilación. En los mamíferos, las rutas de metilación involucran proteínas Tet (*ten-eleven translocation*) que catalizan la oxidación de la 5mdC a 5-hidroximetil-2-desoxicitidina (5hmdC), 5-formil-2-desoxicitidina y 5-carboxil-2-desoxicitidina [130]. En las plantas, la ruta de desmetilación es menos compleja respecto a los animales; los residuos de 5mdC son reconocidos y eliminados del DNA por la familia de DNA glicosilasas [181]. A pesar de que la 5hmdC no es un intermediario de la desmetilación del DNA en las plantas, esta puede ser generada en presencia de especies reactivas de oxígeno y la posibilidad de su eliminación por la maquinaria enzimática de las plantas ha sido analizada recientemente [132]. Cabe resaltar que hay mucha controversia en la información publicada respecto de la presencia de la 5hmdC en plantas [131, 132], por lo que uno de los objetivos de este trabajo es aportar información adicional a este respecto. La toxicidad de las nanopartículas *In vivo* frecuentemente se manifiesta vía daño oxidativo [131, 132], por lo que la 5hmdC podría ser formada en plantas expuestas.

El RNA no codificante participa en la regulación epigenética durante la expresión genética [182]. Algunos autores sugieren que la 5mC proveniente del RNA ribosomal, transferencia, mensajero y una variedad de RNAs pequeños [183, 184] están involucrados en mecanismos que rigen la herencia epigenética [185, 186].

El presente trabajo se ha realizado para desarrollar un procedimiento relativamente simple y confiable, útil para la evaluación del posible efecto causado por nanopartículas metálicas sobre la metilación e hidroximetilación del DNA, así como el efecto sobre la metilación total del ARN en plantas. Para este propósito, el *L. sativum* se creció en medio hidropónico en presencia de nanopartículas de CuO. La translocación, biotransformación y toxicidad de las nanopartículas de cobre ha sido estudiada en diferentes modelos de plantas [174, 187-190], sin embargo la información de su potencial impacto en la metilación de los ácidos nucleicos es escasa [180].

La metodología analítica disponible para la metilación/hidroximetilación ha sido descrita en algunas revisiones así como en la introducción de diferentes artículos de investigación [108, 191-

196]. El enfoque actual, se basa en la hidrólisis enzimática de los ácidos nucleicos y la separación de los nucleósidos obtenidos por HPLC con detección por espectrometría de masas en tándem [192, 195, 197, 198]. Cuando se utiliza una trampa iónica de baja resolución, el monitoreo de reacciones múltiples (MRM) permite obtener una alta sensibilidad y selectividad requeridas especialmente cuando la cantidad de muestra disponible es limitada, así como para el análisis de matrices complejas. La eliminación completa del RNA en muestras de DNA no fue requerida, ya que los desoxiribonucleósidos/ribonucleósidos tanto modificados como sin modificar pueden ser determinados en una sola corrida [193]; adicionalmente, la determinación simultánea del porcentaje de metilación/hidroximetilación del DNA y la metilación total del RNA es posible con el procedimiento aquí propuesto.

La formación de dímeros protonados de citidina (CH^+C) ha sido reportada como un obstáculo en los análisis por ESI-MS y las condiciones instrumentales fueron optimizadas para minimizar este proceso [193, 199, 200]. Por otro lado, los datos experimentales y cálculos teóricos muestran que las citosinas forman homodímeros cuyo enlace es más fuerte comparado con otras nucleobases (la energía del enlace calculada por estudios computacionales para estos dímeros es de $44.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$ [201]) y su formación en fase gaseosa es favorecida en condiciones ligeramente ácidas [202, 203]. En este trabajo, los nucleósidos: C, 5mC, dC, 5mdC y 5hmdC fueron separados cromatográficamente y sus dímeros protonados fueron utilizados como iones precursores para su cuantificación mediante MRM basada en una y dos transiciones (dímero protonado – monómero protonado y dímero protonado – monómero protonado – ion producto obtenido después de ruptura de enlace glicosídico, respectivamente). Este procedimiento demostró su utilidad en el análisis de diferentes muestras de hidrolizados de ácidos nucleicos provenientes de plantas expuestas a diferentes concentraciones de CuO NPs así como DNA hidrolizado de salmón.

IV.4.2 Objetivo

Desarrollar un procedimiento analítico para la determinación del grado de metilación global del DNA y del grado de metilación total del RNA mediante separación cromatográfica de nucleósidos en fase inversa acoplada a espectrometría de masas con ionización por electronebulización y analizador de trampa iónica con monitoreo de reacciones múltiples (HPLC-ESI-ITMS/MS, MRM).

IV.4.3 Condiciones Experimentales

Equipo de laboratorio

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un compartimiento de columna con termostato y automuestreador acoplado en línea con una trampa iónica (AmaZon SL) equipada con una fuente de ionización por electronebulización (Bruker Daltonics). El sistema LC-MS fue controlado por el software *Hystar V3.2*, los datos fueron procesados por *Data Analysis V4.1 SP2* y *QuantAnalysis V2.0 SP2* (Bruker Daltonics). La columna cromatográfica fue una columna Luna C18 (150 x 2 mm, 3 μ m) de Phenomenex. El procedimiento se abrevia como HPLC-ESI-ITMS.

Se utilizó un espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción (ICP-MS, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) modelo 7500ce equipado con celda de colisión/reacción, automuestreador y cámara de rociado tipo Meinhard con enfriamiento (2 °C).

Con propósitos comparativos, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 equipado con una bomba cuaternaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos controlado por Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La columna cromatográfica fue una Luna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) marca Phenomenex. Esta configuración está referida como HPLC-DAD.

Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron grado analítico (Sigma-Aldrich). Acetonitrilo grado HPLC, etanol, isopropanol (Fisher Scientific), y agua desionizada (18.2 M Ω cm⁻¹, Labconco, USA). Los estándares utilizados de citidina (C), 2'-desoxicitidina (dC), uridina (U), 5-metil-2'-citidina (5mC), 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), guanosina (G), desoxiguanosina (dG), timidina (T), adenosina (A), 2'-desoxiadenosina (dA) y 5-hydroxymethyl-2'-desoxicitidina (5hmdC) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Las nanopartículas de CuO fueron compradas de sigma: CAS 1317-38-0, <50 nm de tamaño de partícula.

La solución patrón de cobre (1000 mg L⁻¹) fue obtenida de Sigma. La solución de *tuning* (Li, Mg, Y, Ce, Tl, Co, 10 mg L⁻¹ c/u) fue de Agilent Technologies.

Otros reactivos de sigma fueron: clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), ácido fórmico, formiato de amonio, ácido acético, ácido nítrico, ácido clorhídrico, peróxido de

hidrogeno, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, hipoclorito de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de zinc, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), batocuproina sulfonato de sodio, solución Hoagland [113] (nitrato de calcio 0.35 mM, cloruro de calcio 2.1 mM, cloruro de magnesio 0.91 mM, fosfato monopotásico 0.97 mM, nitrato de potasio 0.255 mM, ácido bórico 23 μM , cloruro de manganeso 3.9 μM , trióxido de molibdeno 23 μM , nitrato férrico 10 μM , nitrato de zinc 0.37 μM , y sulfato de cobre 0.44 μM ajustado a pH 5.8), proteinasa K, desoxiribonucleasa I (DNasa I), nucleasa P1, fosfatasa alcalina (CIAP) fueron de New England Biolabs.

Crecimiento de plantas.

Se utilizaron semillas de *L. sativum* cv. *Ogrodowa* obtenidas de un mercado de Polonia, las condiciones de crecimiento se realizaron de acuerdo a un protocolo anteriormente reportado [112]. De manera breve, las semillas esterilizadas (70% etanol, 3 min; hipoclorito de sodio, 15 min) se lavaron y humectaron con agua desionizada por una hora, en seguida se pusieron a germinar en solución Hoagland por una semana [113]. Las semillas se dividieron en seis grupos; cada uno de los cuales fue expuesta de manera hidropónica en 100 mL de solución ajustada con 0; 5; 10; 50; 250 o 1000 mg L⁻¹ de CuO NPs por una semana. Las plantas fueron cosechadas, lavadas con cloruro de calcio 0.005 mol L⁻¹ y con agua desionizada (baño ultrasónico por 5 min). La mitad de la biomasa fue congelada (-20 °C) y la otra porción fue homogenizada y liofilizada con polytron. El medio fue centrifugado (13000 g, 15 min) y el sobrenadante obtenido se congelo. (-20 °C).

Contenido total de cobre por ICP-MS

Una alícuota (30 mg) de la biomasa liofilizada o medio centrifugado (30 μL) se colocó en un tubo eppendorf, se agregaron 200 μL de estándar interno mezclados con 800 μL de ácido nítrico concentrado y las muestras se calentaron por una hora a 70 °C seguidas de dos horas a 120 °C. Después del enfriarlas a temperatura ambiente, 500 μL de peróxido de hidrogeno fueron agregados y se calentó a 120 °C durante una hora. Finalmente, el volumen se ajustó a 1.5 mL, de los cuales se tomaron 25 μL y se diluyeron a 5 mL. Las condiciones de operación del ICP-MS fueron las siguientes: potencia del plasma 1500 W, flujo del gas en plasma 15 L min⁻¹, flujo del gas en nebulizador 0.89 mL min⁻¹, flujo del gas make-up 0.15 L min⁻¹, profundidad de toma de muestra 8 mm, tiempo de integración 100 ms por isótopo, flujo de helio en la celda de colisiones y

reacciones 4.5 mL min^{-1} . Los isótopos ^{63}Cu , ^{65}Cu fueron monitoreados (se utilizó ^{115}In como estándar interno). Se realizó una curva de calibración de cinco puntos con niveles de concentración entre $0 - 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ con una concentración de estándar interno de $4.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Las funciones de regresión obtenidas ($R > 0.999$) y el límite de detección evaluado para ^{63}Cu fue de 1.8 ng L^{-1} . La exactitud analítica de este procedimiento fue demostrada analizando como materiales de referencia NIST 1643d y NIST 1572.

Extracción e hidrólisis de los ácidos nucleicos

Se utilizó el proceso de extracción reportado por Aljanabi y Martínez [204]. La extracción se realizó por triplicado para cada condición de exposición. Diez plantas frescas fueron homogenizadas con $500 \text{ } \mu\text{L}$ de búfer de extracción que contenía cloruro de sodio 250 mmol L^{-1} , EDTA 100 mmol L^{-1} , Tris-HCL 100 mmol L^{-1} en pH 8 (polytron). En seguida, se agregaron $40 \text{ } \mu\text{L}$ de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% (m/v), $8 \text{ } \mu\text{L}$ de proteinasa K 20 mg L^{-1} y la mezcla se incubó una hora a $60 \text{ } ^\circ\text{C}$, en seguida se agregaron $300 \text{ } \mu\text{L}$ de cloruro de sodio 6 mol L^{-1} y se centrifugó a $10\,000 \times g$ por 30 min. El sobrenadante se mezcló con $500 \text{ } \mu\text{L}$ de isopropanol y se mantuvo a $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ para completar la precipitación de los ácidos nucleicos. En seguida se centrifugó ($10\,000 \times g$, 20 min, $4 \text{ } ^\circ\text{C}$), la pastilla se lavó dos veces con $500 \text{ } \mu\text{L}$ de etanol al 70% (v/v). El lavado se repitió con dos porciones de etanol al 70% conteniendo batocuproina (10 mmol L^{-1} , pH 5.6 con formiato de amonio) y finalmente con etanol al 70%. Para determinar la pureza de los ácidos nucleicos, se analizaron al azar diferentes muestras disolviendo las pastillas en $50 \text{ } \mu\text{L}$ de agua Milli-Q y se midió su espectro de absorción (220-350 nm, Spectronic 3000, Milton RoyCo. Ltd.); se obtuvo una relación de $A_{260}/A_{280} > 1.8$ [205, 206]. En base a estas mediciones, se determinó el contenido aproximado de $50 \text{ } \mu\text{g}$ de ácidos nucleicos por muestra extraída (de $\sim 500 \text{ mg}$ de biomasa fresca).

Para la hidrólisis enzimática, se utilizó una modificación del método establecido por Rozhon y col. [207]. Cada pastilla de ácidos nucleicos se llevó a $42 \text{ } \mu\text{L}$ con agua Milli-Q, se agregaron $5 \text{ } \mu\text{L}$ de buffer de hidrólisis (ácido acético 0.2 mol L^{-1} , glicina 0.2 mol L^{-1} , cloruro de magnesio 50 mmol L^{-1} , cloruro de zinc 5 mmol L^{-1} , cloruro de calcio 2 mmol L^{-1} , pH 5.3). La muestra se incubó con $2 \text{ } \mu\text{L}$ de DNAsa I ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) y $1 \text{ } \mu\text{L}$ de nucleasa P1 ($1.25 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 12 horas, en seguida se congeló y después se calentó por 5 min en agua hirviendo para evitar la posible contaminación con microorganismos. En seguida, se adicionaron $5 \text{ } \mu\text{L}$ de hidróxido de sodio 100

mmol L⁻¹ y 2 µL de CIAP (1 U µL⁻¹), la muestra se incubó por 2 horas más a 37 °C. Finalmente, el volumen se llevó a 200 µL con fase A (formiato de amonio 5 mmol L⁻¹)

Procedimiento HPLC-ESI-ITMS

Las muestras y las soluciones de calibración fueron filtradas (filtros Whatman 0.22-µm) y se inyectaron en el sistema cromatográfico (2 µL, ~500 ng de ácidos nucleicos). La separación de 11 nucleósidos y desoxiribonucleósidos se llevó a cabo en una columna Luna C18 (150 x 2 mm, 3 µm) a 35 °C y el flujo se fijó en 0.15 mL min⁻¹. El gradiente de elución se llevó con dos fases móviles (A – formiato de amonio 5 mmol L⁻¹; B – acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% v/v) y fue el siguiente: 0 min 3% B, 15 min 30 % de B, 18 min 80% B, 20 min 3% B.

El efluente de la columna se introdujo en la fuente ESI operada en modo positivo con los siguientes parámetros: voltaje de electrospray alternado en 4500 V; voltaje de plato 500 V; presión del nebulizador 1.8 bar (N₂); gas de secado 6 L min⁻¹ (N₂); temperatura de fuente 200 °C y el voltaje de la salida del capilar 140 V. Los espectros de masas se adquirieron en modo de operación “UltraScan” para un rango *m/z* 100-600 con un control de carga de iones (ICC) ajustado a 100,000 con tiempo máximo de acumulación de 100 ms. La trampa fue calibrada de manera externa con una mezcla de *tuning* (“ESI tuning Mix” de baja concentración, Agilent). Se utilizó ajuste de parámetros inteligente (SPS) para una *m/z* de 250. Se utilizó helio como gas de colisión; los espectros de masas MS² y MS³ se obtuvieron con los mismos parámetros de ICC. Para la cuantificación mediante MRM, el aislamiento de iones se realizó con $\Delta m/z \pm 2$ y 100 ms de tiempo de adquisición; la amplitud de fragmentación fue de 0.5 V; el software utilizado para la cuantificación de los resultados fue Bruker QuantAnalysis calculando las áreas de pico de los iones cuantificadores de sus respectivos cromatogramas de MRM, los parámetros cuantificación para cada compuesto se presentan en la Tabla 4.17.

Con la finalidad de cubrir el rango esperado de los nucleósidos en las muestras de plantas, una serie de soluciones de calibración que contenían 0, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10 ng de cada compuesto fueron inyectadas en 2 µL.

Los porcentajes de recuperación se determinaron en plantas expuestas a 50 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹ de CuO NPs; dos alícuotas de 50 µL cada una fueron diluidas cuatro veces; una con fase móvil A, y la segunda fue adicionada con 10 µL de una mezcla de estándares (5 µg mL⁻¹) y llevada a 200 µL con fase móvil A. Se realizaron tres réplicas de cada análisis.

Análisis HPLC-DAD

El % de metilación del DNA fue evaluado usando un método reportado anteriormente [108]. La columna se mantuvo a 35 °C, el gradiente se llevó con tres fases móviles (buffer de fosfatos pH 4.1, agua Milli-Q y metanol) con un flujo de 1.0 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 40 µL. La calibración se realizó en base a inyecciones de 1, 10, 20, 50, 50, 100, 200, 500 ng de cada compuesto en una mezcla de solución estándar.

IV.4.4 Resultados y discusión

Desarrollo del método

Las condiciones de HPLC fueron seleccionadas tomando en cuenta los siguientes criterios: (1) fase móvil simple y compatible con ESI-MS; (2) pH ligeramente ácido para favorecer la formación de los homodímeros protonados en la fuente ESI [203]; (3) separación aceptable de los once compuestos en un tiempo razonablemente corto; (4) lavado/re-equilibrio eficiente de columna. Usando un gradiente de elución con formiato de amonio 5 mmol L⁻¹ y acetonitrilo conteniendo ácido fórmico al 0.1 % (v/v), la separación se logró en 12 minutos sin requerirse ningún ajuste adicional de pH (pH 5.6). La corrida cromatográfica se extendió a 20 min con la finalidad de evitar efectos de memoria e interferencias en la ionización, especialmente en el análisis de extractos de plantas. El tiempo de retención con su respectiva desviación estándar relativa basada en cinco inyecciones no sucesivas para los once compuestos se presenta en la Tabla 4.17. Se obtuvieron los espectros de masas mediante el análisis en ESI positivo en modo *full scan*, observándose que el ion más abundante para las citosinas fue el del homodímero protonado (2M+H)⁺ mientras que para U, G, dG, T, A y dA los iones mayoritarios fueron sus moléculas protonadas (M+H)⁺. La Figura 4.35 muestra los espectros de masa adquiridos para C, dC, 5mdC, 5hmdC, y 5mC así como sus EIC para cada dímero y monómero protonado. La estructura de los dímeros se presenta en la Figura 4.36 [203]. La fragmentación aplicada en modo auto MS² produce monómeros protonados de las citidinas (M+H)⁺, para los demás compuestos produce pérdidas neutrales de ribosa (M+H-132)⁺ o desoxiribosa (M+H-116)⁺. Cuando se aplica una segunda fragmentación a las citosinas (M+H)⁺, el enlace glicosídico se rompe dando como producto la nucleobase protonada. En el desarrollo de esta metodología, se consideran dos procedimientos basados en MRM; (1) determinación de once

compuestos basados en una sola transición (MS^2) y (2) determinación de cinco compuestos que contienen citosina basados en dos transiciones (MS^3).

Tabla 4.17 Parámetros MRM para los compuestos de citosinas (aislamiento con $\Delta m/z \pm 2$, amplitud de fragmentación de 0.5 V)

Analito	MM	T_{ret}, min (RSD, %)^a	Tiempo^b, min	ion precursor, m/z	MS² ion cuantificador, m/z	MS³ ion cuantificador, m/z
C	243.22	3.79 (1.0)	0-7.3	487	244	112
dC	227.22	4.35 (5.1)	0-7.3	455	228	112
5hmdC	257.24	4.54 (3.6)	0-7.3	515	258	142
U	244.20	4.87 (4.2)	0-7.3	245	113	-
5mC	257.24	5.27 (1.5)	0-7.3	515	258	126
5mdC	241.24	6.86 (5.3)	0-7.3	483	242	126
G	283.24	7.50 (2.9)	7.3-12	284	152	-
dG	267.24	8.21 (3.5)	7.3-12	268	152	-
T	242.23	9.25 (0.6)	7.3-12	243	127	-
A	267.24	9.62 (1.5)	7.3-12	268	136	-
dA	251.24	9.95 (1.0)	7.3-12	252	136	-

^a – RSD calculado de cinco replicas no sucesivas

^b – Tiempo de adquisición

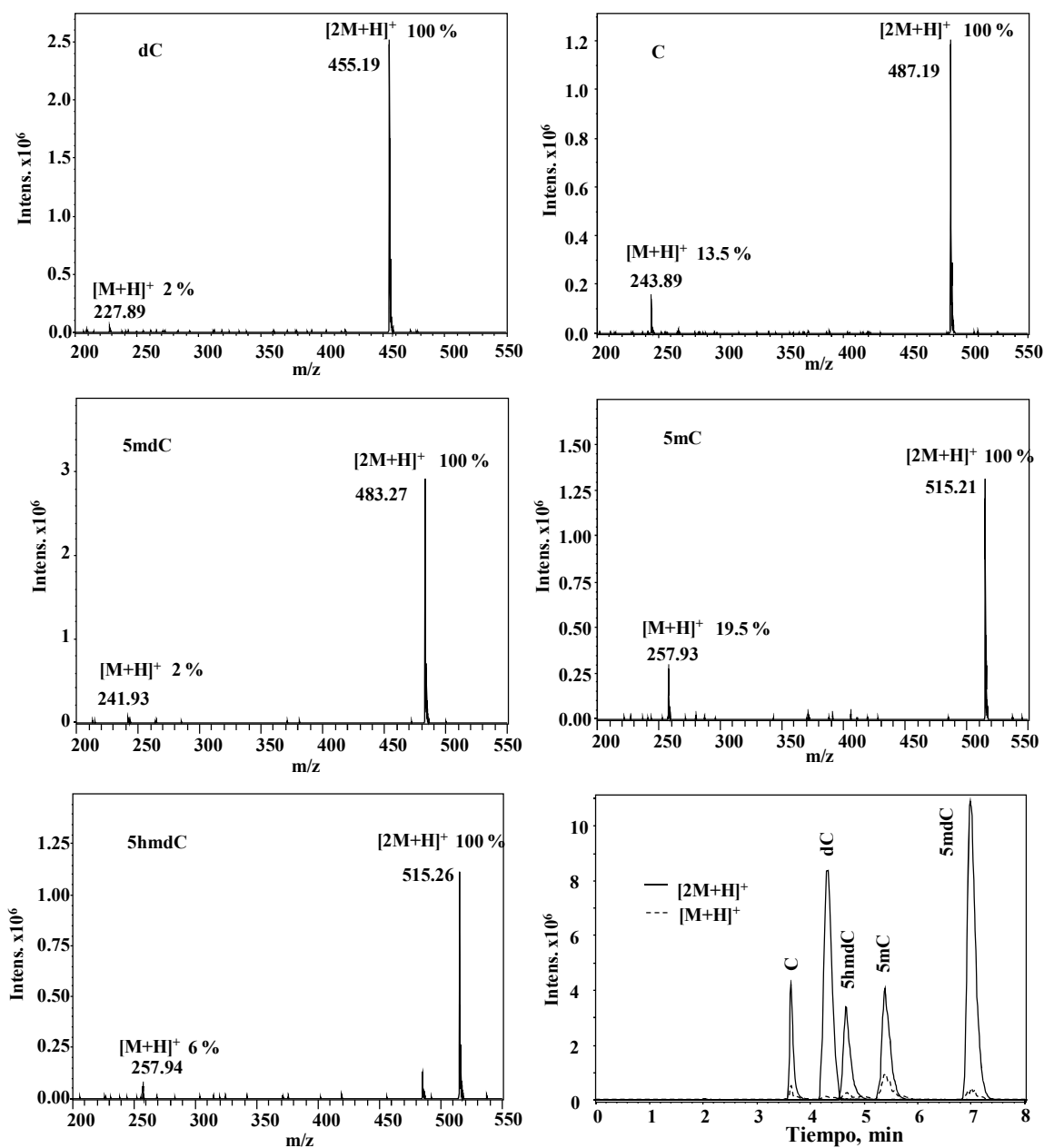


Figura 4.35 Espectro de masas en modo *full scan* adquirido para las diferentes citosinas inyectadas al sistema HPLC-ESI(+)-ITMS (20 ng cada uno) y los cromatogramas de iones extraídos adquiridos para cada compuesto en su forma de dímero protonado $(2M+H)^+$ o monómero protonado $(M+H)^+$. El nombre de cada compuesto se indica sobre la figura.

Estructura general ¹	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄	m/z (2M+H) ⁺	Dímero
	ribosa	H	H	487	C
	desoxiribosa	H	H	455	dC
	desoxiribosa	CH ₃ OH	CH ₃ OH	515	5hmdC
	ribosa	CH ₃	CH ₃	515	5mC
	desoxiribosa	CH ₃	CH ₃	483	5mdC

¹ – Adaptado de *J Am Soc MassSpectrom*, 2004, 15,268-279

Figura 4.36 Estructuras de homodímeros protonados para los diferentes compuestos que contienen citosinas.

Como se indica en la Tabla 4.17, la corrida cromatográfica fue dividida en dos segmentos en los que se estudió el efecto de las amplitudes de fragmentación (0.2 – 1.0 V con $\Delta m/z \pm 2$). Se seleccionó una amplitud de 0.5 V basándose en el criterio de mayor relación señal/ruido para todos los compuestos en una y dos transiciones (La Figura 4.37 muestra el efecto de la amplitud de fragmentación en la relación S/N de los once compuestos; con fines comparativos, se utilizó tanto ESI positivo como negativo). En la Tabla 4.17, se muestran los iones precursores y cuantificadores de cada compuesto en condiciones de MS² y MS³ (los cromatogramas para una mezcla de los once compuestos se muestra en la Figura 4.38). Las soluciones de calibración y los parámetros analíticos típicos se obtuvieron para cada compuesto. A manera de ejemplo, la Figura 4.39 muestra los cromatogramas HPLC-ESI-ITMS³ de algunas de las soluciones de calibración. Los resultados para los nucleósidos que contienen citosina se presentan en la Tabla 4.18 para MS² y MS³ (la Tabla 4.19 muestra los parámetros para MS² de los nucleósidos que no contienen citosinas). Es importante recalcar que los límites de detección en la columna de los cinco compuestos de interés estuvieron en el rango de 9-35 fmol usando MS² y 20-122 fmol utilizando MS³; estos valores fueron menores comparados a 0.2-12.8 fmol reportados utilizando instrumentación con más poder de resolución (analizadores de masa tipo trampa lineal – cuadrupolo, orbitrap o triples cuadrupolos) [193, 195, 199, 208]; sin embargo, el poder de detección extremadamente alto no fue crítico en el análisis de plantas debido a cantidad de biomasa relativamente grande al igual que el porcentaje de metilación comparado con el encontrado en el genoma de los animales. Por otra parte, las trampas iónicas convencionales son menos costosas, menos susceptibles a las variaciones

de condiciones instrumentales, fáciles de operar y permiten varias fragmentaciones sucesivas. Cuando se utiliza más de una transición mediante MRM, la pérdida de sensibilidad es inevitable, pero al mismo tiempo el ruido espectral puede ser eliminado más eficientemente con los beneficios que implica en términos de exactitud y precisión. Los límites de detección obtenidos por MS² fueron mejores comparados con MS³, sin embargo la repetitividad es mejor para MS³ (valores de RSD para la pendiente y precisión en 1 ng, Tabla 4.18).

Tabla 4.18 Funciones de regresión lineal evaluadas para los cinco compuestos que contienen citosinas, límites de detección (DL) y límites de cuantificación (QL) evaluados en para MRM en modo MS² y MS³

Analito	Función de calibración ¹	R	RSD pendiente ²	LD ³		LQ ⁴		CV ⁵ %
				ng	fmol	ng	fmol	
<i>MRM basado en una transición (MS²)</i>								
C	A = (1.493c-0.055)x10 ⁶	0.9993	4.5	0.008	35	0.028	116	1.4
dC	A = (3.904c-0.069)x10 ⁶	0.9988	6.4	0.003	11	0.008	37	1.5
5hmdC	A = (1.403c-0.086)x10 ⁶	0.9992	5.8	0.010	41	0.035	135	1.5
5mC	A = (2.351c-0.226)x10 ⁶	0.9926	6.2	0.006	22	0.019	75	1.8
5mdC	A = (4.370c-0.184)x10 ⁶	0.9985	3.0	0.002	9	0.007	31	1.3
<i>MRM basado en dos transiciones (MS³)</i>								
C	A = (0.581c-0.016)x10 ⁶	0.9997	6.0	0.030	122	0.099	407	1.1
dC	A = (2.134c-0.047)x10 ⁶	0.9953	2.9	0.005	23	0.018	77	0.4
5hmdC	A = (1.079c-0.057)x10 ⁶	0.9992	2.9	0.011	43	0.037	142	0.7
5mC	A = (1.348c-0.097)x10 ⁶	0.9929	4.4	0.011	42	0.036	139	1.0
5mdC	A = (2.987c-0.212)x10 ⁶	0.9994	2.6	0.005	20	0.016	67	0.4

¹ A - área de pico del ion cuantificador; c - concentración, µg mL⁻¹

² RSD -evaluado para 3 procesos de calibración independientes

³ LD - límite de detección evaluado con base a S/N = 3

⁴ QL - límite de cuantificación evaluado con base a S/N = 10 [209]

⁵ CV - evaluado para cinco inyecciones no sucesivas de estándar de calibración (1 ng en columna)

Tabla 4.19 Funciones de regresión lineal evaluadas para Uridina, guanósina, desoxiguanósina, timidina, adenosina y desoxiadenosina; límites de detección (DL) y límites de cuantificación (QL) evaluados en modo MRM para MS²

Analito	Función de calibración ¹	R	RSD pendiente ²	LD ³		LQ ⁴		CV ⁵ %
				ng	fmol	ng	fmol	
U	$A=(0.081c+0.001)10^6$	0.9996	4.55	0.041	168	0.137	560	2.3
G	$A=(0.799c+0.028)10^6$	0.9932	7.31	0.011	40	0.037	135	1.6
dG	$A=(0.690c+0.011)10^6$	0.9974	5.00	0.010	38	0.033	128	1.9
T	$A=(0.142c+0.007)10^6$	0.9989	0.35	0.041	170	0.137	567	2.7
A	$A=(3.807c+0.298)10^6$	0.9846	1.29	0.002	8	0.007	28	1.3
dA	$A=(7.226c+0.213)10^6$	0.9923	3.07	0.002	7	0.007	24	0.9

¹ A - área de pico del ion cuantificador; c - concentración, $\mu\text{g mL}^{-1}$

² RSD -evaluado para 3 posesos de calibración independientes

³ LD - límite de detección evaluado con base a S/N = 3

⁴ QL - límite de cuantificación evaluado con base a S/N = 10 [209]

⁵ CV - evaluado para cinco inyecciones no sucesivas de estándar de calibración (1 ng en columna)

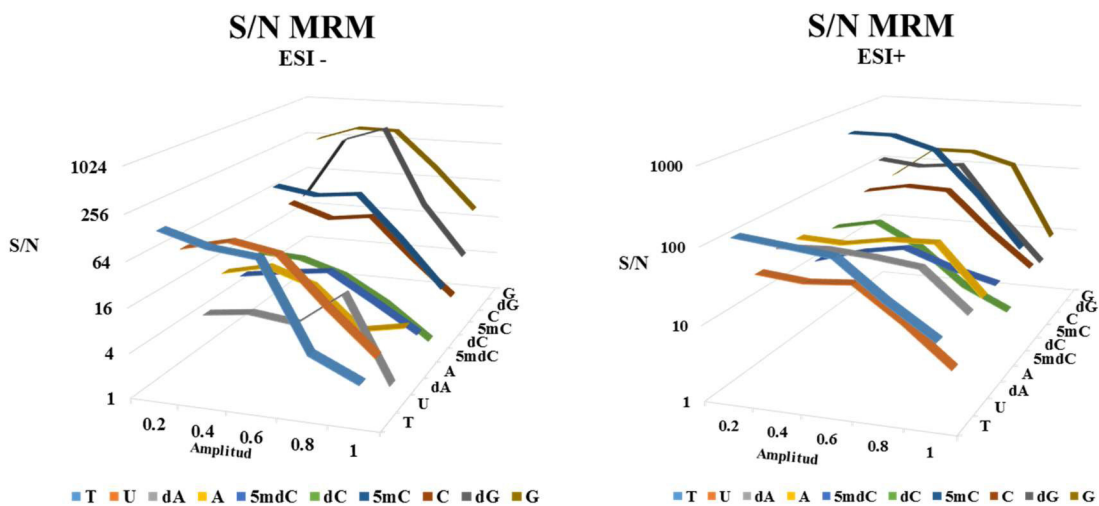


Figura 4.37 Efecto de la amplitud de fragmentación en la relación S/N de 11 nucleósidos obtenidos para ESI alternado (10 ng cada uno).

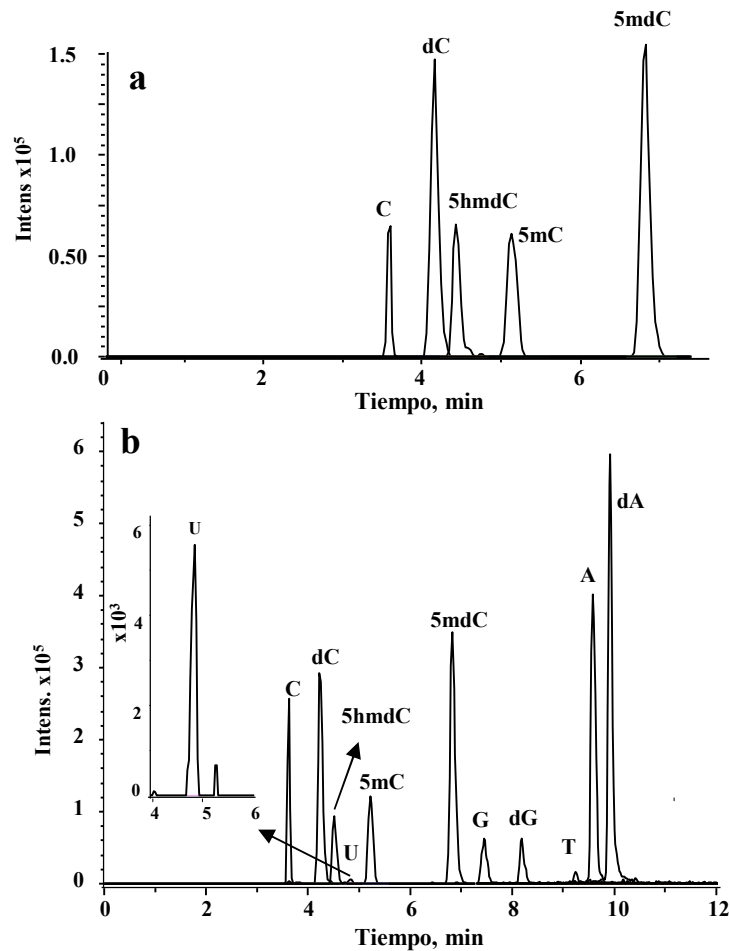


Figura 4.38 Cromatograma típico obtenido para una solución estándar de los 11 compuestos (1 ng cada uno).

a) MRM basado en dos transiciones: C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126.

b) MRM basado en una transición: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136.

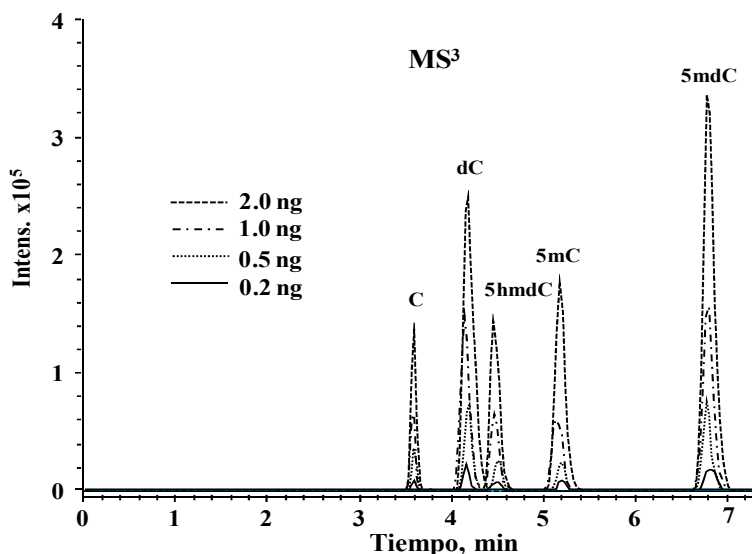


Figura 4.39 Cromatogramas HPLC-ESI-ITMS obtenidos para soluciones de calibración en modo MS³. Las cantidades correspondientes para cada inyección se muestran en la Figura.

Desempeño del método en el análisis de plantas

Para asegurar la extracción del DNA con una porción representativa del RNA contenido en la muestra, se aplicó el procedimiento de Aljanabi y col. [51, 204]. Algunos cromatogramas obtenidos en modo *full scan* para plantas expuestas a CuO NPs mostraron la presencia de dímeros unidos a cobre (2M + Cu)⁺. Estos aductos fueron observados en los espectros de masas a pesar de la presencia de EDTA en el buffer de extracción y a pesar de llevar a cabo lavados de la pastilla de ácidos nucleicos. Para eliminar el cobre de los dímeros y así evitar posible errores de cuantificación, la pastilla que contenía los ácidos nucleicos fue lavada adicionalmente con etanol conteniendo batocuproina disuelta en formiato de amonio de la fase móvil A (pH 5.6). Los aductos de cobre ya no se detectaron después de este procedimiento. Un espectro típico obtenido en el tiempo de elución de la 5mdC para el mismo extracto de plantas con y sin lavado con batocuproina se presenta en la Figura 4.40. Estos datos concordaron con previos reportes sobre la solubilización parcial de CuO NPs en plantas y sugerencias sobre posible reducción parcial de Cu(II) a Cu(I) [187, 210]. La formación de aductos de Cu(I) con nucleósidos es de gran importancia biológica y requiere mayor investigación. Sin embargo, para el propósito de este procedimiento, se requiere de la eliminación de los aductos de cobre con el fin de evitar errores analíticos en la evaluación de la metilación/hidroximetilación de ácidos nucleicos.

Para probar la exactitud del procedimiento, dos muestras fueron enriquecidas con una mezcla de estándares (0.5 ng de cada nucleósido, descrito en la parte experimental) y analizadas usando MRM en condiciones MS^2 y MS^3 ; los cromatogramas respectivos se presentan en la Figura 4.41. Para MS^2 , los porcentajes de recuperación para los 11 compuestos se mantuvieron dentro del rango de 80-118%; en el caso de MS^3 , el rango de recuperación fue 88-110% (los resultados detallados de esta cuantificación se presentan en la Tabla 4.20). Cabe recalcar que la 5hmdC no se detectó en ninguna muestra, por lo que la hidroximetilación no se considerara en lo sucesivo.

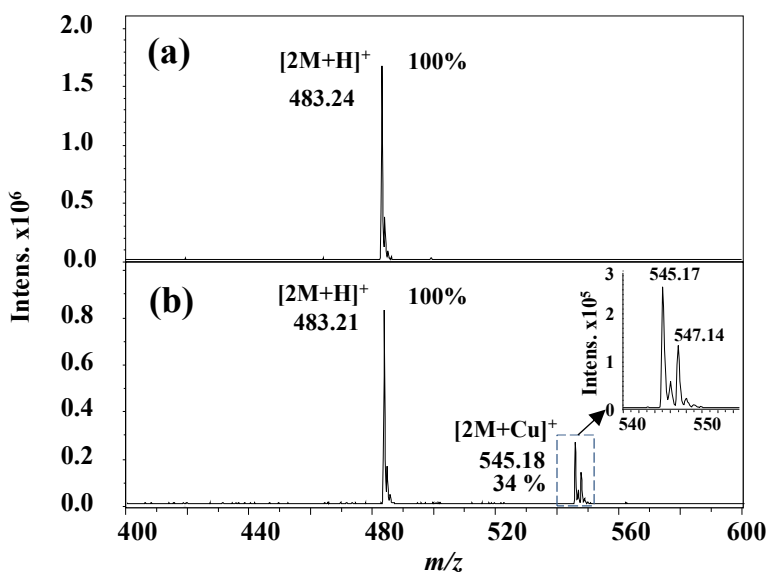


Figura 4.40 Espectro de masa *full scan* adquirido para hidrolizados de DNA (*L. sativum* expuesto a CuO NPs 1000 mg L⁻¹; 6.79 a 6.92 min).

a) Ácidos nucleicos lavados con batocuproina

b) Sin lavado (se amplifica patrón isotópico característico de cobre).

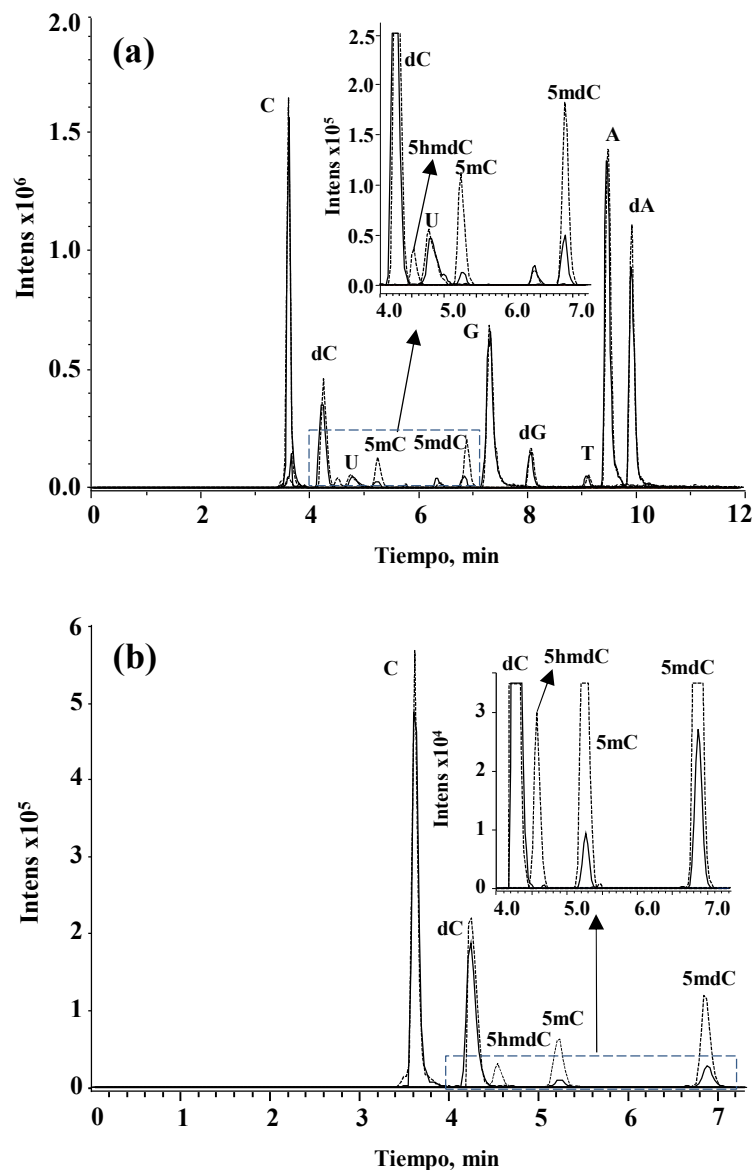


Figura 4.41 Cromatogramas obtenidos para hidrolizados de ácidos nucleicos de plantas expuestas a CuO NPs antes y después de adición de estándar (0.5 ng de cada compuesto en la columna, descripción mostrada en parte experimental).

a) *L. sativum* crecido en presencia de CuO NPs 1000 mg L⁻¹; condiciones MS² (C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136)

b) *L. sativum* crecido en presencia de CuO NPs 50 mg L⁻¹; condiciones MS³ (C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126).

Tabla 4.20 Resultados obtenidos de la adición de estándar (0.5 ng en columna para cada compuesto) usando condiciones MS² y MS³.

Analito	Promedio ± SD, ng por 2 µL de inyección		Recuperación %	Promedio ± SD, ng por 2 µL de inyección		Recuperación %
	Muestra	Muestra + 0.5 ng		Muestra	Muestra + 0.5 ng	
	MS ²			MS ³		
C	20.72±1.1	21.1±1.2	100	20.7±1.2	21.2±0.80	100
dC	2.50±0.12	2.98±0.14	96	2.60±0.09	3.01±0.12	94
5hmdC	<DL	0.48±0.06	94	<DL	0.44±0.05	92
U	14.6±0.09	15.01±1.1	80	-	-	-
5mC	0.20±0.03	0.81±0.08	116	0.21±0.02	0.74±0.08	106
5mdC	0.31±0.04	0.82±0.09	102	0.32±0.02	0.81±0.05	98
G	32.7±1.7	33.1±1.5	80	-	-	-
dG	2.96±1.4	3.38±1.2	84	-	-	-
T	2.98±1.3	3.56±0.7	116	-	-	-
A	15.6±1.2	16.1±2.3	100	-	-	-
dA	3.12±0.14	3.71±0.19	118	-	-	-

La metilación global del DNA y RNA fueron evaluadas como la relación molar 5mdC/(5mdC+dC)·100 y 5mC/(5mC+C)·100, respectivamente. Como primera aproximación, el DNA de esperma de salmón (sigma) fue analizado como muestra de referencia obteniéndose un porcentaje de metilación global de 6.89 ± 0.05% en condiciones MS³ y 6.89 ± 0.06% en MS², lo que concordó con resultados actualmente reportados usando diferentes procedimiento analíticos [211, 212].

Con la finalidad de evaluar los posibles efectos de matriz en el material proveniente de plantas, algunas diluciones seriales fueron analizadas, utilizando para este propósito hidrolizados de *L. sativum* expuesto a CuO NPs (250 mg L⁻¹) e hidrolizados de DNA de salmón como referencia. En ambos casos 200, 150, 75, 50, 25 y 10 ng de DNA se inyectaron al sistema cromatográfico. En el caso de las muestras de ADN de salmón (Sigma) se pudo determinar con facilidad la masa inyectada, sin embargo, en el caso de las muestras de plantas, se requirió de una estimación. De manera aproximada, se calculó que la distribución relativa de RNA y DNA introducida a la columna fue aproximadamente 10:1, basada en la relación de (C+5mC)/(dC + 5mdC) de la intensidad de las señales [51]; de acuerdo con esto, 2 µL de muestra que contenían 200 ng de DNA tenía aproximadamente 2 µg de RNA. Es necesario recalcar que la estimación antes mencionada

no consideró las diferentes sensibilidades obtenidas para cada compuesto de manera individual, ni la presencia de un gran número de modificaciones de ribonucleósidos encontradas en las plantas. Por otra parte, la masa precisa de DNA/RNA no fue requerida dado que la metilación global se refiere a la cantidad relativa de citosinas metiladas con respecto al total de citosinas presentes en la muestra sin importar la cantidad inyectada. Los cromatogramas obtenidos para DNA de salmón usando MS² y MS³ se presentan en la Figura 4.42a y 4.42b, respectivamente (panel izquierdo). El panel derecho de las mismas figuras muestra las señales analíticas de 5mdC (área de pico) y el porcentaje de metilación global de DNA obtenido para cada cantidad inyectada al sistema. La línea de tendencia calculada para la 5mdC en función de la masa de DNA muestra una linealidad ligeramente mejor ($R = 0.999$) para MS³ con respecto de MS² ($R = 0.993$); no obstante en ambos casos no se observó una desviación importante de la linealidad dentro de todo el rango de masa inyectada. Adicionalmente es importante mencionar que los porcentajes de metilación del DNA no parecieron ser afectados por la dilución de la muestra (Figura 4.42), lo que indicó que en estas condiciones no hay interferencias. Cabe remarcar que en MS² se observó una precisión ligeramente más pobre en comparación con MS³, especialmente en las inyecciones de menor masa (RSD fue mayor para el rango de 10-50 ng, Figura 4.42), lo que implicó una mejor eliminación de ruido en las condiciones MS³.

En la Figura 4.43, se presentan los cromatogramas HPLC-ESI-ITMS³ correspondientes a diferentes cantidades de ácidos nucleicos provenientes de plantas junto a sus líneas de tendencia para las señales de 5mdC y 5mC y los porcentajes de metilación de DNA y RNA. A pesar de que la cantidad de muestra de plantas inyectada a la columna fue mucho mayor que la inyectada de DNA de salmón (2.2 µg DNA + RNA de plantas contra 0.2 µg de DNA en las muestras más concentradas provenientes de salmón), las líneas de tendencia para las dos citidinas metiladas presentaron excelente linealidad en todo el rango de masa estudiado ($R > 0.999$). El valor promedio obtenido del porcentaje de metilación de todas las cantidades de muestra analizadas para DNA y RNA fue $11.030 \pm 0.04\%$ y $1.02 \pm 0.05\%$, respectivamente. Como se observa en la Figura 4.43, el DNA en el rango de 50 – 100 ng (0.5 – 1 µg RNA) parece ser el más apropiado para el análisis debido a que los porcentajes de metilación presentan la menor desviación estándar así como porcentajes de metilación prácticamente idénticos comparados con las otras diluciones de muestra analizadas. A pesar de que la cantidad de DNA y RNA inyectada de las plantas es imprecisa, se

puede observar que grandes cantidades presentes de RNA tienen poco efecto en la ionización del 5mdC.

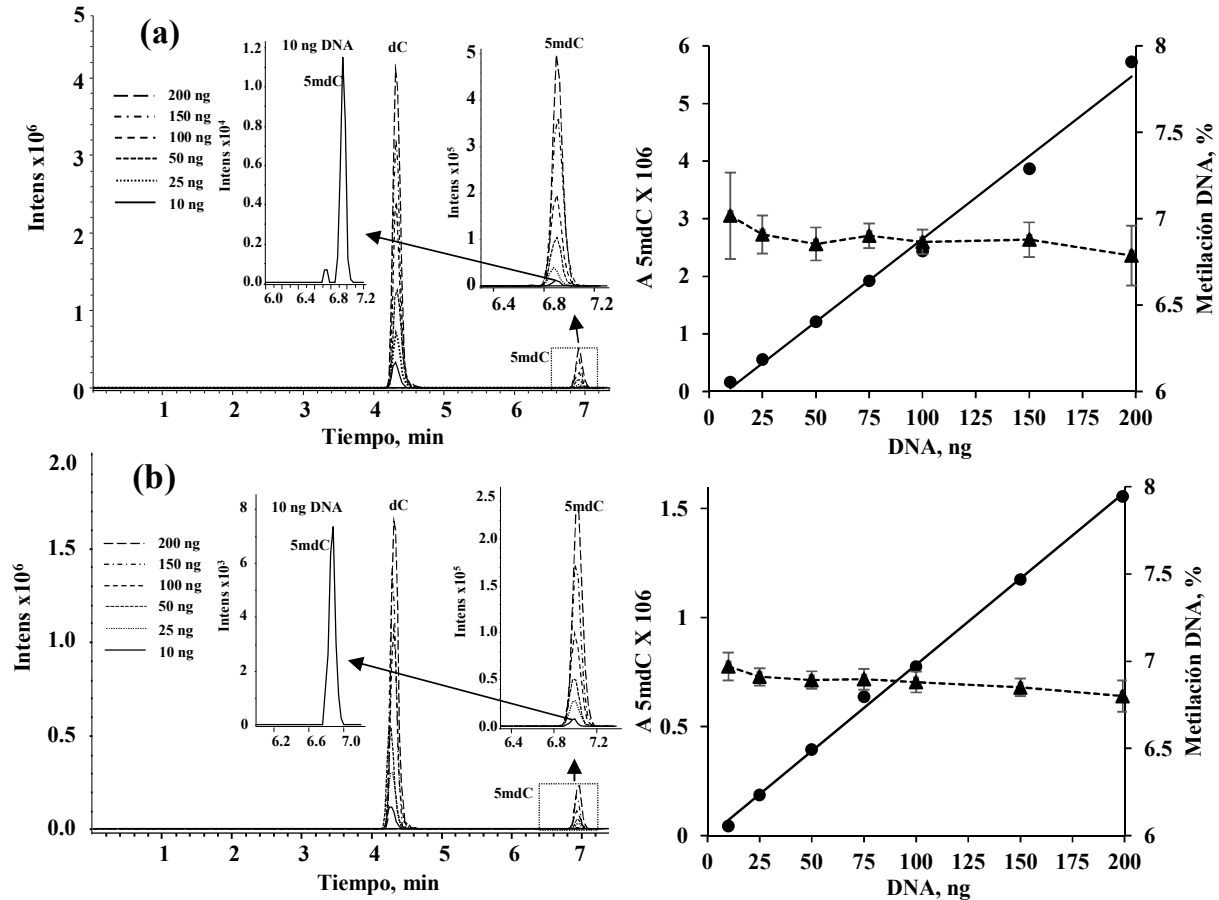


Figura 4.42 panel izquierdo- cromatograma HPLC-ESI-ITMS para diferentes cantidades de DNA de salmón inyectada al sistema (las cantidades inyectadas se indican en la figura de acuerdo al tipo de línea). Panel derecho- efecto de la masa de DNA inyectada sobre la señal de 5mdC (área de pico, línea sólida) y porcentaje metilación del DNA de salmón (línea semicontinua). (SD basada en 3 réplicas).

a) MRM en condiciones MS²; dC 455/228, 5mdC 483/242

b) MRM en condiciones MS³; dC 455/228/112, 5mdC 483/242/126

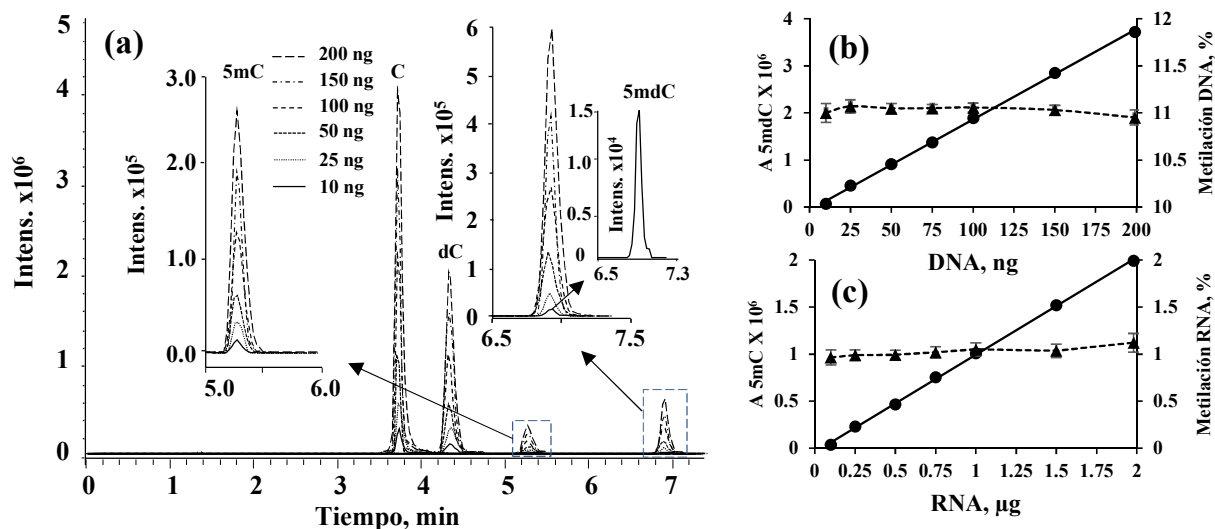


Figura 4.43 Efecto de la masa de ácidos nucleicos inyectada al sistema HPLC-ESI-ITMS³ para *L. sativum* expuesto a 250 mg L⁻¹ de CuO NPs (SD basada en 3 réplicas).

- a) MRM en condiciones MS³; C 487/244/112, dC 455/228/112, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126
- b) Señal para 5mdC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de DNA inyectada así como sus respectivos porcentajes de metilación de DNA evaluados (línea semicontinua)
- c) Señal para 5mC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de RNA inyectada así como sus respectivos porcentajes de metilación de RNA evaluados (línea semicontinua).

Finalmente, los resultados HPLC-ESI-ITMS² para las diluciones seriales de hidrolizados de *L. sativum* se presentan en la Figura 4.44. A pesar de la mayor intensidad de los picos cromatográficos, las líneas de tendencia para 5mdC ($R = 0.994$) y 5mC ($R = 0.997$) fueron ligeramente peores que las comparadas con las condiciones MS³. Más importante, el porcentaje de metilación evaluado para el DNA ($11.00 \pm 0.10\%$, promedio de todas las diluciones) y RNA ($1.12 \pm 0.09\%$) fueron más afectados por la cantidad de muestra inyectada y los resultados para cada muestra fueron ligeramente menor precisos con respecto a MS³ (Figura 4.43 y 4.44). Sin embargo, las muestras correspondientes a un contenido entre 50-100 ng de DNA en 2 µL de inyección parecen ser apropiadas también para el análisis por MS²; el porcentaje de metilación evaluado para DNA y RNA en este rango fueron de $11.05 \pm 0.03\%$ y $1.12 \pm 0.01\%$, respectivamente. Con base a los resultados presentados en esta sección, aproximadamente 50 ng de DNA fueron introducidos en la columna para el análisis de extractos de plantas.

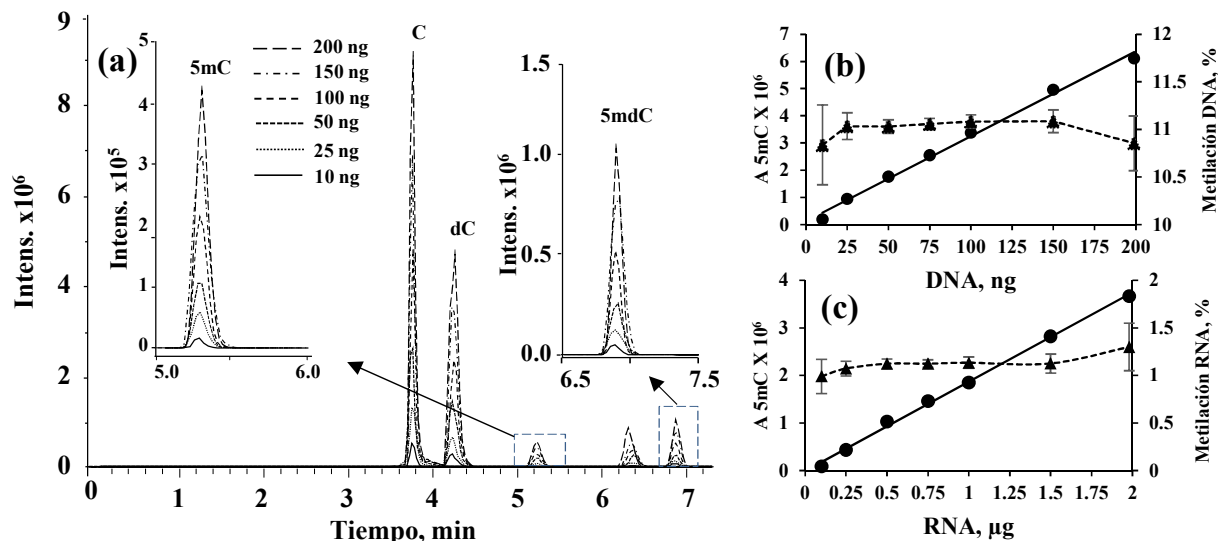


Figura 4.44 Efecto de la masa de ácidos nucleicos inyectada al sistema HPLC-ESI-ITMS² para *L. sativum* expuesto a 250 mg L⁻¹ de CuO NPs (SD basada en 3 réplicas).

- a) Cromatogramas MRM: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, 5mC 515/258, 5mdC 483/242.
- b) Señal para 5mdC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de DNA inyectada con sus respectivos porcentajes de metilación de DNA evaluados (línea semicontinua)
- c) Señal para 5mC (área de pico, línea sólida) graficada contra la cantidad de RNA inyectada con sus respectivos porcentajes de metilación de RNA evaluados (línea semicontinua).

Análisis de extractos de plantas

L. sativum, fue crecido bajo exposición de CuO NPs como se describió anteriormente, después de cosechado, se midió la longitud de sus raíces así como la parte aérea para una muestra de 50 plantas por cultivo. La presencia de NPs en el medio no reveló impacto considerable en la parte aérea, sin embargo, el crecimiento de las raíces fue claramente inhibido incluso a concentraciones relativamente bajas de 10 mg L⁻¹ (Figura 4.45). Se realizaron medidas de clorofila (SPAD-502) para diversas muestras aleatorias de cada tratamiento y no se observaron efectos tóxicos visibles a ninguna concentración (la Figura 4.46 muestra fotos de cultivos así como sus mediciones de clorofila). Para cada condición de exposición, se determinó la cantidad de cobre total en las muestras liofilizadas así como en el medio centrifugado (13 000 x g, 15 min). Cabe señalar que se obtuvo una pastilla oscura claramente visible en las muestras centrifugadas, especialmente en las concentraciones más altas de CuO NPs; la concentración encontrada en el medio de cultivo centrifugado es considerada como indicativo del cobre solubilizado. Los resultados mostrados en la Tabla 4.21 demuestran que el *L. sativum* absorbe un porcentaje relativamente bajo del cobre

agregado en forma de CuO NPs (0.1 – 20.2 %), sin embargo para concentraciones crecientes de NPs en el medio, la cantidad de cobre presente en la biomasa aumentó gradualmente. Adicionalmente, el efecto de los exudados de plantas en la solubilización de nanopartículas es marginal, lo que concordó con reportes previos [170, 187]. Los datos obtenidos sugieren que el cobre se incorporó a las plantas en forma de NPs, lo que concuerda con anteriores reportes [170, 187]. La detección de aductos de cobre con dímeros de citosinas metiladas así como su eliminación de los espectros de masa lavando los extractos de plantas con un agente complejante de Cu(I), indicaron que las CuO NPs fueron parcialmente solubilizadas *in vivo*.

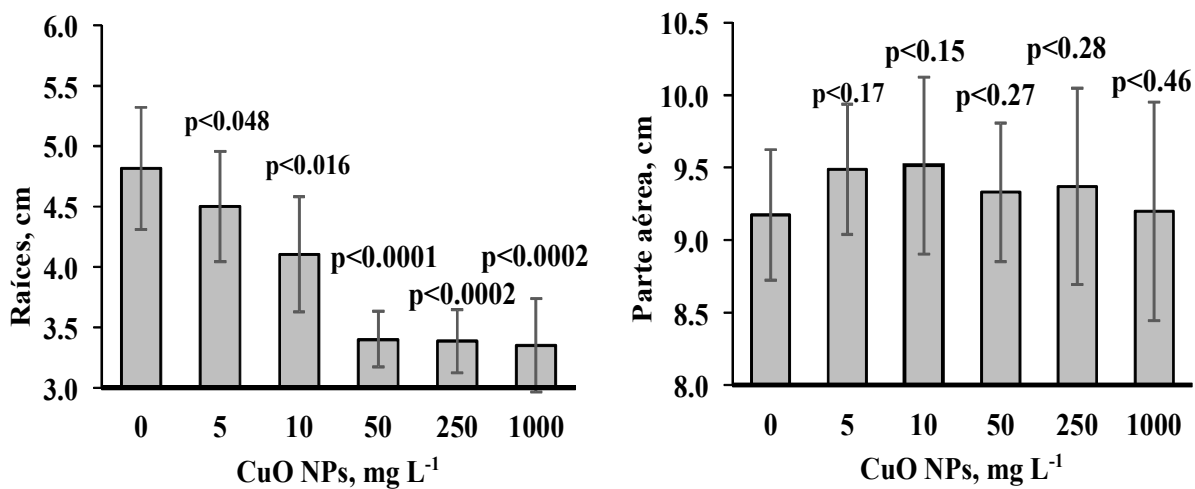


Figura 4.45 Efecto de la concentración de CuO NPs agregadas al medio de crecimiento en la longitud de las partes aéreas y raíces de *L. Sativum*.

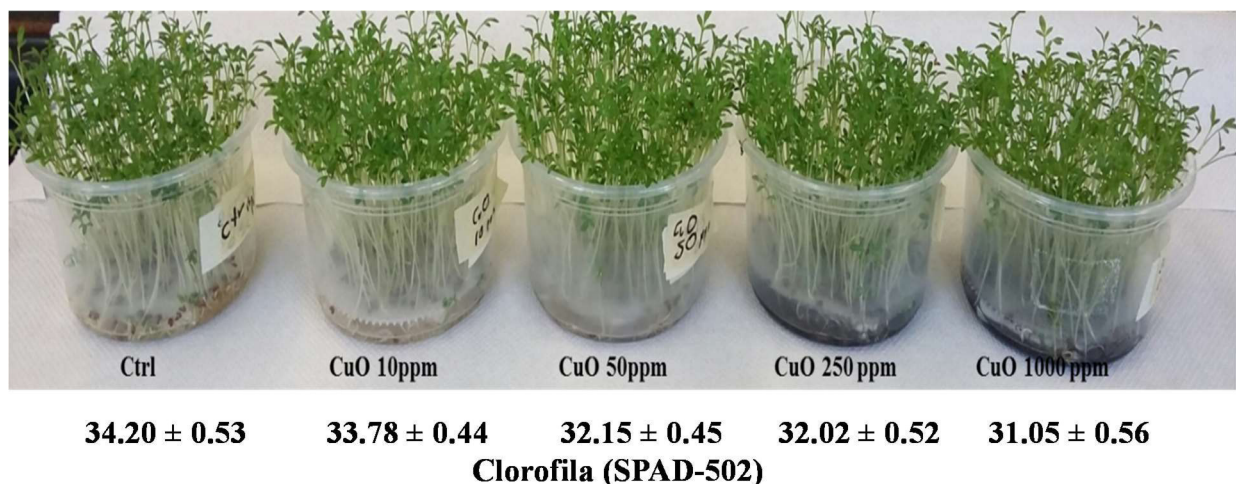


Figura 4.46 Fotos de cultivos de *L. sativum* bajo diferentes condiciones de exposición con sus respectivos resultados para clorofila (unidades SPAD \pm SD, 15 hojas).

Tabla 4.21 Distribución del cobre en los cultivos hidropónicos de *L. Sativum* determinado para diferentes concentraciones de CuO NPs agregadas a la solución Hoagland.

Cu agregado al medio		Cu determinado en biomasa ¹		Cu en medio centrifugado		Cu residual ⁴ como CuNPs, %
CuO NPs, mg L ⁻¹	Cu Total, ² mg	Promedio \pm SD, μ gCu g ⁻¹	Total Cu, ³ μ g	Mean \pm SD, μ gCu L ⁻¹	Cu Total ² , μ g	
0	0	30.4 \pm 3.4	19.7	0.03 \pm 0.02	0.003	-
10	0.80	248 \pm 24	161	0.13 \pm 0.01	0.013	79.8
50	3.99	832 \pm 2	541	0.18 \pm 0.01	0.018	86.5
250	20.0	1034 \pm 4	672	0.32 \pm 0.01	0.032	96.6
1000	79.9	1227 \pm 133	797	0.73 \pm 0.01	0.073	99.0

¹ Biomasa liofilizada

² 100 mL de solución Hoagland

³ ~650 mg de biomasa liofilizada por cultivo

⁴ Calculado como: $\{(\text{mg Cu agregado}) - (\text{mg Cu en biomasa}) - (\text{mg Cu en medio centrifugado})\} / (\text{mg Cu agregado})$

Una vez demostrada que la cantidad de cobre en las plantas mantenía una dependencia con las condiciones de exposición, los procedimientos HPLC-ESI-ITMS² y MS³ así como HPLC-DAD [108] fueron utilizados para determinar la metilación global de los ácidos nucleicos extraídos para cada cultivo. Como se mencionó previamente, la 5hmdC no se detectó en ninguna muestra. Para las plantas control, el porcentaje de metilación global del DNA fue de $13.03 \pm 0.21\%$ usando condiciones MS³, $13.23 \pm 0.35\%$ para MS² y $12.92\% \pm 0.32\%$ para HPLC-DAD. El grado de concordancia entre estos tres valores fue indicativo de una buena exactitud. El grado de metilación

global de todos los cultivos se presenta en la Figura 4.47 donde se puede observar que los tres procedimientos muestran resultados muy similares. Es importante resaltar que la cuantificación mediante MRM en condiciones MS² y MS³ arrojaron una precisión similar en concordancia con las Figuras 4.42 y 4.43 para inyecciones de DNA entre 50 – 100 ng. En la presencia de 5 y 10 mg L⁻¹ de CuO NPs, se detectó un incremento en la metilación global, la cual puede ser atribuida a la respuesta defensiva de la planta [213]; sin embargo, a mayores concentraciones de CuO en el medio, se aprecia claramente una tendencia hacia la hipometilación. La hipometilación ha sido relacionada en plantas sometidas a estrés abiótico [51, 213], pero hasta ahora, la información sobre el efecto de nanopartículas metálicas es muy escasa [178]; el procedimiento HPLC-MS³ o MS² propuesto ha demostrado su utilidad para la evaluación de los cambios en la metilación en respuesta a nanopartículas metálicas.

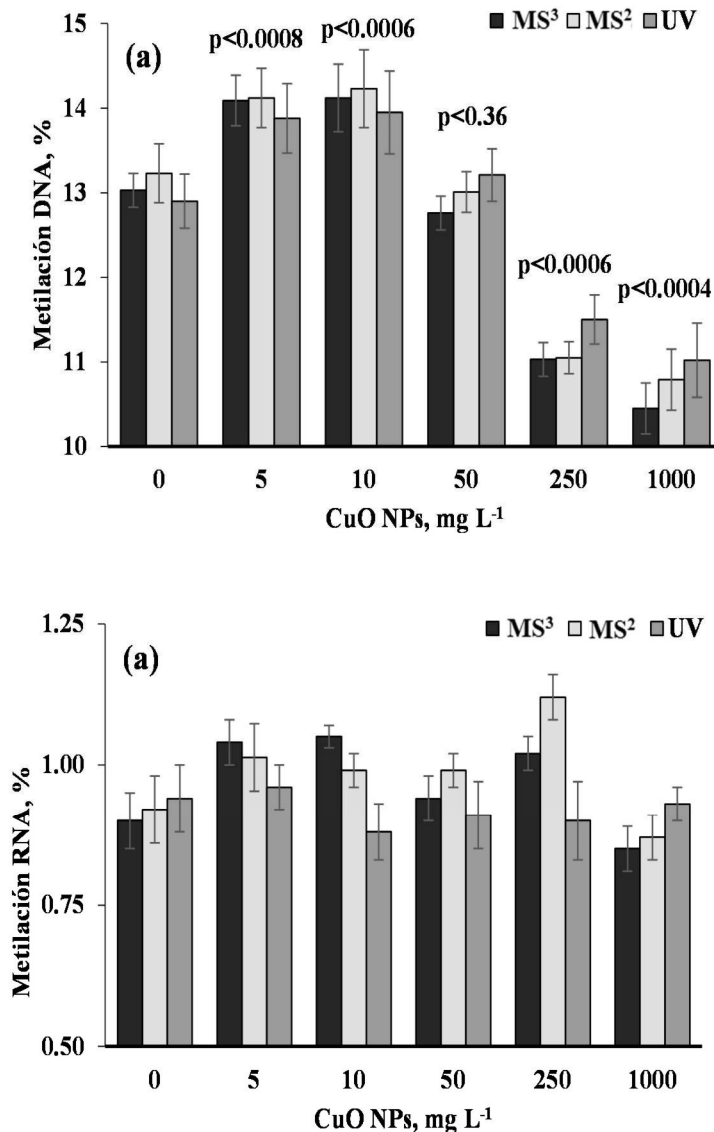


Figura 4.47 Efecto de CuO NPs sobre el porcentaje de metilación global de ácidos nucleicos en *L. sativum*. Comparación mediante procedimientos HPLC-ESI-ITMS², HPLC-ESI-ITMS³ y HPLC-DAD.

a) Metilación global de DNA

b) Metilación total de RNA

Los resultados obtenidos para el RNA usando espectrometría de masas y detección con arreglo de diodos también fueron coherentes. Para plantas no expuestas, los porcentajes de metilación determinados fueron $0.91 \pm 0.02\%$ para MS³, $0.92 \pm 0.04\%$ mediante MS² y $0.94 \pm 0.06\%$ con detección DAD, los cuales fueron similares a previos reportes utilizando diferentes procedimientos analíticos [51]. Como se puede apreciar en la Figura 4.47, la exposición a CuO NPs no presentó

un efecto visible en la metilación del RNA. Dentro de la discusión del posible papel de la 5mC sobre la maquinaria epigenética, los resultados obtenidos difieren en cuanto al cambio de la metilación del RNA reportados previamente [51, 184, 185], al menos en el caso concreto de exposición a CuO NPs como agente estresante. Dentro del punto de vista analítico, el procedimiento aquí propuesto puede ser usado para evaluar el grado de metilación total de RNA en niveles < 1%.

IV.4.5 Conclusiones

Se estableció un procedimiento relativamente simple para la determinación de once nucleósidos (C, dC, 5hmdC, U, 5mC, 5mdC, G, dG, T, A, dA) en extractos de ácidos nucleicos en plantas usando separación cromatográfica en fase inversa acoplada mediante ESI(+) con detector másico de trampa iónica con cuantificación por MRM. Se demostró que la formación de homodímeros de citosinas protonados en la fuente de ionización puede ser usada con propósitos cuantitativos; la aplicación de dos transiciones mejoró la selectividad para C, dC, 5hmdC, 5mC y 5mdC que están en la lista de interés para la evaluación del grado de metilación o hidroximetilación global de DNA y RNA. A pesar de que se obtuvieron mejores límites de detección para MS² comparados con MS³, la utilización de dos transiciones permitió la eliminación de interferencias de tal manera que el procedimiento fue menos susceptible a la variación en la cantidad/composición de muestra introducida en el sistema. Este aspecto es muy importante en el análisis de muestras biológicas complejas en las que la cantidad de ácidos nucleicos en la columna es difícil de controlar. De hecho esta información no es requerida para la evaluación del grado de metilación global dado que el porcentaje de metilación se mantiene constante en cualquier porción de la muestra. En la aplicación del procedimiento propuesto para el análisis de plantas expuestas a CuO NPs, se detectaron aductos de cobre con los dímeros de citidinas (modo *full scan*). Se realizó un lavado adicional de los ácidos nucleicos con batocuproina para eliminar las especies contenidas de cobre. La presencia de estos aductos indicó al menos la parcial solubilización *in vivo* de las CuO NPs y posible presencia de Cu(I). Esta eliminación fue necesaria para evitar errores de cuantificación.

El crecimiento de las partes aéreas y el contenido de clorofila en *L. sativum*, no se vieron afectados por la exposición a CuO NPs (0 – 1000 mg L⁻¹), sin embargo el crecimiento de las raíces

sí fue inhibido. Se demostró que la absorción de las nanopartículas por las plantas fue relativamente baja (0.1- 22% del total del cobre agregado al medio). Para concentraciones más altas que 50 mg L⁻¹, la metilación global del DNA disminuyó con respecto a las plantas control, como se ha reportado comúnmente para plantas expuestas a estrés abiótico. Sobre los reportes controversiales de la hidroximetilación de citosinas en plantas, en este estudio la 5hmC no se detectó en ninguna muestra.

IV.5 Aplicación de cromatografía de líquidos acoplado con espectrometría de masas en tándem para el análisis de modificaciones de ácidos nucleicos en *Lepidium Sativum* expuesto a nanopartículas de óxido de cobre.

IV.5.1 Introducción

En el análisis de extractos de ácidos nucleicos de las plantas expuestas a CuO NPs, se observó la elución de un gran número de compuestos adicionales a los 11 descritos anteriormente. Estos nucleósidos liberados corresponden a otro tipo de modificaciones que no sean metilación de citosinas en el C5 del anillo pirimidínico. Resultaba de gran interés hacer un análisis de estos compuestos, evaluar su posible cambio dependiendo de las condiciones de exposición de las plantas así como asignar estos compuestos a modificaciones ya descritas puesto que se sabe que plantas han desarrollado mecanismos de regulación orientados a tolerar el estrés en los que las modificaciones epigenéticas juegan un papel primordial. Estos mecanismos involucran genes asociados con diferentes rutas interconectadas que llevan a una mejor tolerancia al estrés [72]. Así pues, la sobrevivencia de las plantas en condiciones adversas depende en gran medida de la regulación de los genes involucrados en su respuesta a dicho estrés, esto es mediante mecanismos epigenéticos. De aquí el interés por desarrollar procedimientos analíticos que nos permitan conocer más de las modificaciones sufridas en los nucleósidos como mecanismo de tolerancia o adaptación. Cabe señalar, que a pesar de que la biotransformación y toxicidad de nanopartículas ha sido estudiada en diferentes modelos de plantas, la información sobre la modificación de los ácidos nucleicos es muy limitada.

IV.5.2 Objetivo

Realizar el análisis de las modificaciones de ácidos nucleicos en *L. sativum* crecido en presencia de nanopartículas de CuO, empleando para ello el sistema HPLC-ESI-ITMS.

IV.5.3 Condiciones Experimentales

Las condiciones experimentales referentes al equipo del laboratorio, reactivos y muestras utilizadas, el crecimiento de plantas, extracción e hidrolisis de ácidos nucleicos así como el procedimiento HPLC-ESI-ITMS son las mismas que las descritas en la sección IV.3.3 con las siguientes modificaciones: se utilizó un escaneo de tipo *full scan* con fragmentación tipo MSⁿ (MS² como primera fragmentación y MS³ como segunda fragmentación en aquellos compuestos en los que MS² produjo algún ion producto en suficiente cantidad para aplicar una segunda fragmentación); la cantidad inyectada al sistema fue de 10 µL y se utilizó con fines cualitativos una mezcla de estándares (“Nucleoside Test Mix”, Supelco) que contenía: C, 50.0 mg L⁻¹; G 25.0; inosina (I), 25.0 mg L⁻¹; pseudouridina (Ψ) 25 mg L⁻¹; 5-metiluridina (5mU) 50.1 mg L⁻¹; U 25.0 mg L⁻¹; 1-metiladenosina 25 (m¹A) mg L⁻¹; tiocitidina (S²C) 10 mg L⁻¹; 2'-O-methylcytidine (Cm) 20 mg L⁻¹; 3-metilcitidina (3mC) 100.2 mg L⁻¹, 5mC 100.0 mg L⁻¹, 7-metilguanosina (7mG) 25.0 mg L⁻¹.

IV.5.4 Resultados y discusión

Las condiciones utilizadas para este análisis son las mismas que las descritas anteriormente con la diferencia que en este caso se llevó a cabo la detección durante 20 min de la corrida cromatográfica (12 min en la sección anterior), en dichos análisis se observó la presencia de un gran número de picos desconocidos en los extractos de ácidos nucleicos cuya intensidad en algunos casos muestra una relación dependiente con la concentración de las CuO NPs. A manera de ejemplo, la Figura 4.48 muestra un cromatograma HPLC-ESI-ITMS típico de hidrolizados de ácidos nucleicos en los que se aprecia la complejidad en la composición de los nucleósidos presentes, por lo que se decidió asignar estos picos desconocidos haciendo uso de la información de las modificaciones descritas en la literatura y basándose en la información que proporciona la técnica utilizada y que se describirá brevemente a continuación. Cabe mencionar que una vez asignados los picos, en caso de resultar un analito de gran relevancia biológica, se puede proceder a la compra o síntesis del compuesto asignado con el objetivo de reducir/eliminar la probabilidad de un falso positivo o con fines cuantitativos. Asimismo, sería recomendable, analizar las fracciones de la columna mediante espectrometría de masas y de masas en tándem de alta resolución.

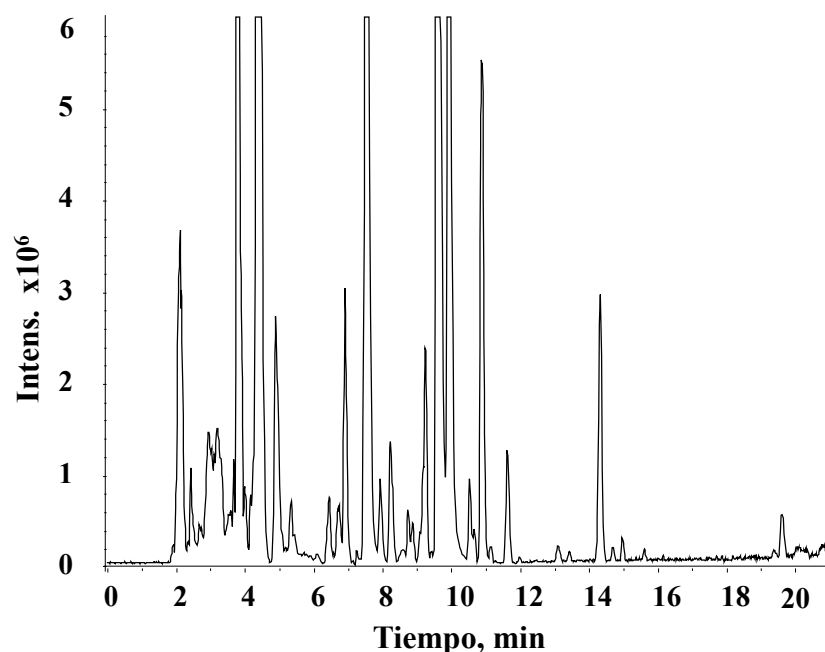


Figura 4.48 Típico cromatograma de pico base obtenido del análisis HPLC-ESI-ITMS de hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (250 mg L^{-1}).

Perdidas neutras constantes

Una ventaja de usar detección por espectrometría de masas es la posibilidad de hacer escaneo de *perdidas neutras constantes* (CNL por sus siglas en inglés), el cual está definido como un escaneo de masas en tándem en el que se registra una diferencia de masas asignada (“offset”) entre el ion fragmentado y su producto. Dado que las especies neutras no se pueden observar en un detector de masas, estas se detectan por diferencias entre valores de m/z de dos iones de los que un ion precursor se convierte en ion producto tras perder un fragmento sin carga). En el caso de los nucleósidos, las CNL proporcionan información de gran utilidad ya que permiten elucidar si un compuesto detectado proviene del DNA (desoxiribosa- CNL 116 Da) o RNA (ribosa- CNL 132 Da) siempre y cuando la modificación no sea en el azúcar. En la Figura 4.49, se presentan cromatogramas de las pérdidas neutras para una muestra real (plantas expuestas a 250 mg L^{-1} CuO NPs). En la Tabla 4.22 se muestra la asignación de las pérdidas constantes analizadas en este estudio.

En el análisis de HPLC-ESI-ITMS² realizado, se observaron pérdidas neutras de 146 Da correspondientes a la masa de ribosa metilada (Figura 4.50a), lo que permitió discriminar entre

nucleósidos metilados en la nucleobase o en el azúcar. Para ejemplificar la utilidad de esta información se planteará el caso de las guanosinas metiladas con un solo grupo metilo, todas ellas con la misma m/z 298 y fragmentos de m/z 152 indicativos de la presencia de guanina. Cabe señalar que la 1-metilguanosa (m^1G), N-metilguanosa (m^2G) y la 2'-O-metilguanosa (Gm) fueron reportadas como nucleósidos modificados anteriormente [5]. Como se aprecia en la Figura 4.50a para un EIC de m/z 298, se detectaron tres compuestos con tiempos de retención 9.08, 9.19 y 9.43 min; en la Figura 4.50b se presenta el mismo cromatograma, obtenido para CNL de 132 y 146 Da. Se puede observar que los picos con T_R 9.08 y 9.43 min, les corresponde una CNL de 132 Da (ribosa) lo que implica que su metilación ocurrió en la nucleobase. Por su parte, al compuesto con T_R 9.19 min le corresponde una CNL de 146 Da, lo que permite concluir que su metilación tuvo lugar en el azúcar y este compuesto podría ser la Gm. Para discernir entre la posición de los otros dos isómeros, se requiere de información adicional como puede ser su polaridad relativa.

Polaridad

Para los nucleósidos que presentan la misma CNL, se puede distinguir entre isómeros con el grupo metilo en diferente posición tomando en cuenta diferencias en polaridad, reflejadas en respectivos tiempos de retención de cada uno de ellos. De esta manera, la posición del metilo en el grupo amino disminuiría la polaridad del nucleósido de manera más significativa que la posición de este grupo en el carbono 1 del anillo citosínico, aumentando su tiempo de retención; lo que sugiere que el compuesto con T_R 9.08 min es m^1G y en 9.46 min le correspondería m^2G (Figura 4.50). La información obtenida en base al BPC, CNL y polaridad relativa debe ser cotejada con los patrones de fragmentación MS^n .

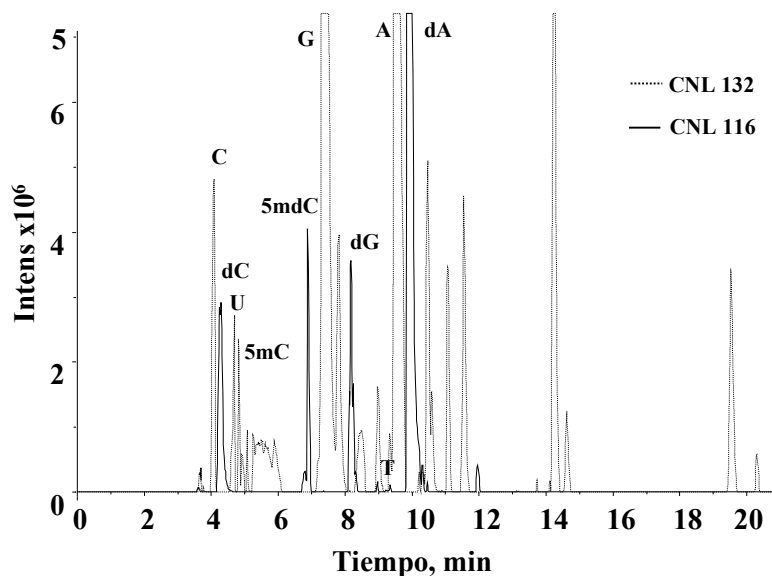


Figura 4.49 Cromatograma HPLC-ESI-CNL para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L⁻¹). CNL de 116 Da (línea sólida) para pérdidas de desoxiribosa y 132 Da (línea semicontinua) para ribosa.

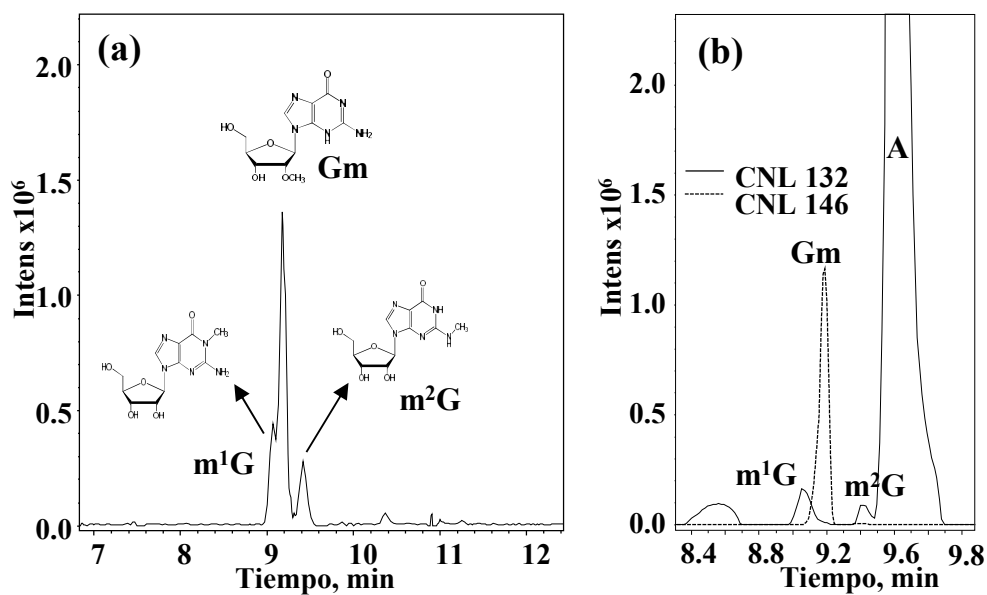


Figura 4.50 a- EIC para m/z de 298; **b-** Cromatograma de pérdidas neutras constantes de 132 Da (línea sólida, ribosa) y 146 Da (línea semicontinua, 2'-O-metilribosa) para DNA de berros expuestos a CuO NPs (250 mg L⁻¹). El nombre de cada nucleósido se muestra en la Tabla 4.22.

Patrones de fragmentación MSⁿ

El análisis de MSⁿ permite obtener información estructural de gran utilidad, en el caso de los nucleósidos y a excepción de los homodímeros, la primera fragmentación (MS²) rompe el enlace

N-glicosídico liberando el azúcar como ya se mencionó anteriormente; adicionalmente, si los fragmentos presentan suficiente intensidad, estos pueden ser susceptibles a siguientes fragmentaciones en trampa iónica y de esta manera es posible proponer estructuras como N⁶-(*cis*-hidroxiisopentenil)adenosina (io⁶A, Figura 4.51); la io⁶A pierde ribosa después de su primera fragmentación MS² en la que el patrón isotópico de la nucleobase concuerda con la estructura propuesta (Figura 4.51a). Así mismo, los fragmentos encontrados para MS³ (Figura 4.51c) explican la estructura sugerida en la Figura 4.51d. Este nucleósido juega un papel vital en la regulación del crecimiento, desarrollo y bioquímica de algunas plantas [214] o el su derivado tiometilado 2-metiltio-N⁶-(*cis*-hidroxiisopentenil) adenosina (msio⁶A) el cual ha sido relacionado con una mejora en la eficiencia de decodificación del tRNA [215] y se encuentra en la misma ruta de modificación enzimática que io⁶A.

Patrón isotópico

La Figura 4.52a muestra el patrón isotópico para el nucleósido que se eluyó en 19.6 min (Figura 4.52b) sugerido como msio⁶A. Es importante señalar que el patrón isotópico es especialmente útil en el caso de compuestos que presentan átomos con un patrón isotópico menos común al del resto de los elementos presentes en las biomoléculas. En caso del azufre (³²S, 95.02%; ³³S, 0.75%; ³⁴S, 4.21%) en el que su isotopo ³⁴S con 4.21% de abundancia permite comparar la intensidad relativa de cuatro señales isotópicas. En el caso concreto de la msio⁶A {(M+H⁺), 100%; (M+H⁺+1), 20.4%; (M+H⁺+2), 7.5; (M+H⁺+3), 1.2%)} el patrón isotópico encontrado con el teórico presentan una perfecta correlación (Figura 4.52). Otro ejemplo aún más concluyente de esta información se observa en la Figura 4.40 (Sección IV.4.4) donde gracias a esta información, se detectó el dímero de la 5mdC formando un aducto con el cobre, el cual presenta un patrón característico de este elemento. Cabe señalar que sin esta información sería difícil observar la presencia del aducto de cobre llevando a posibles errores de cuantificación.

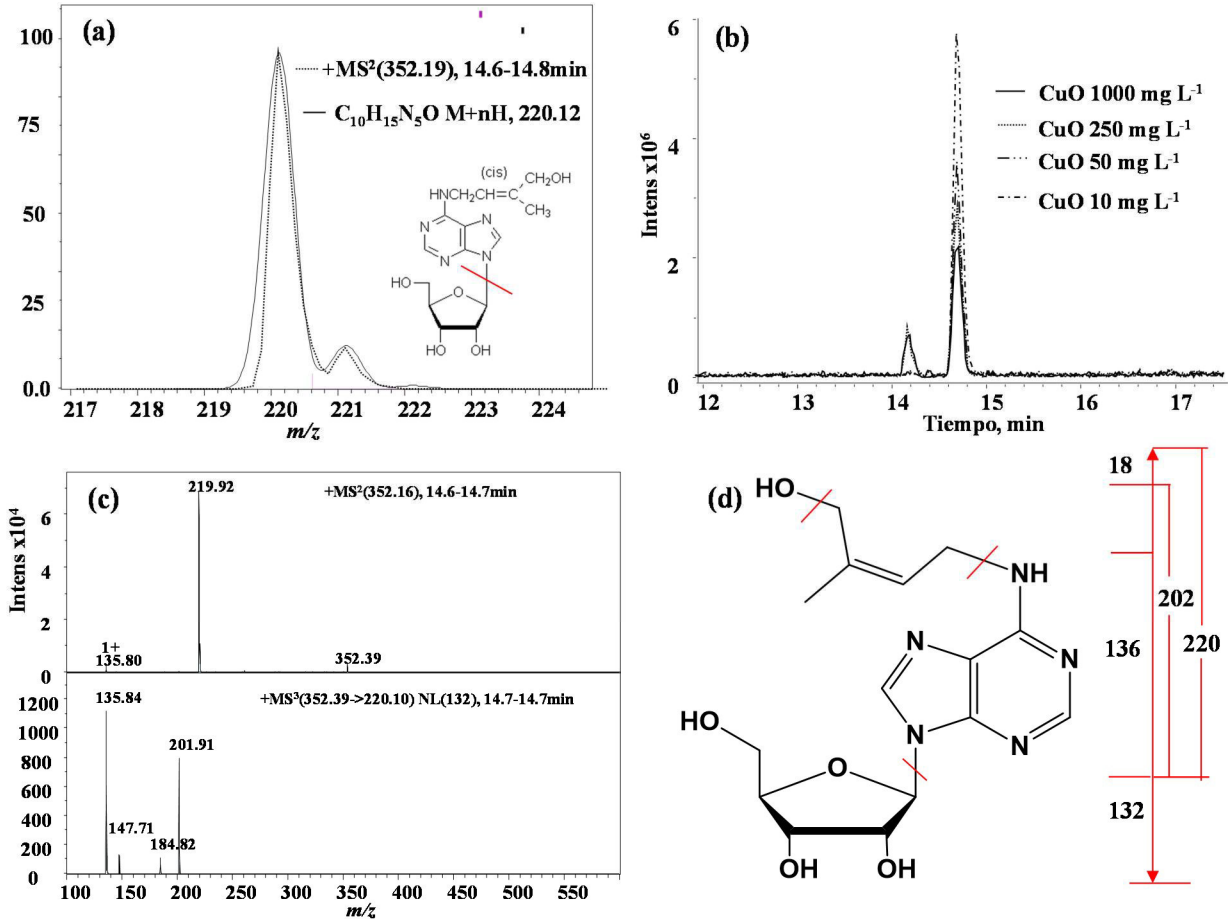


Figura 4.51 a- Comparación de padrón isotópico del nucleósido con tiempo de elución 14.6 min (compuesto referido como 33) después de su pérdida neutra de 132 Da (línea semicontinua) con su patrón teórico (línea sólida) para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L⁻¹); b- EIC *m/z* 352 para diferentes condiciones de exposición a CuO NPs (tipo de línea y concentración de cada exposición mostrado en la Figura); c- padrón de fragmentación MS² (arriba) y MS³(abajo); d- esquema de fragmentación sugerida para io⁶A.

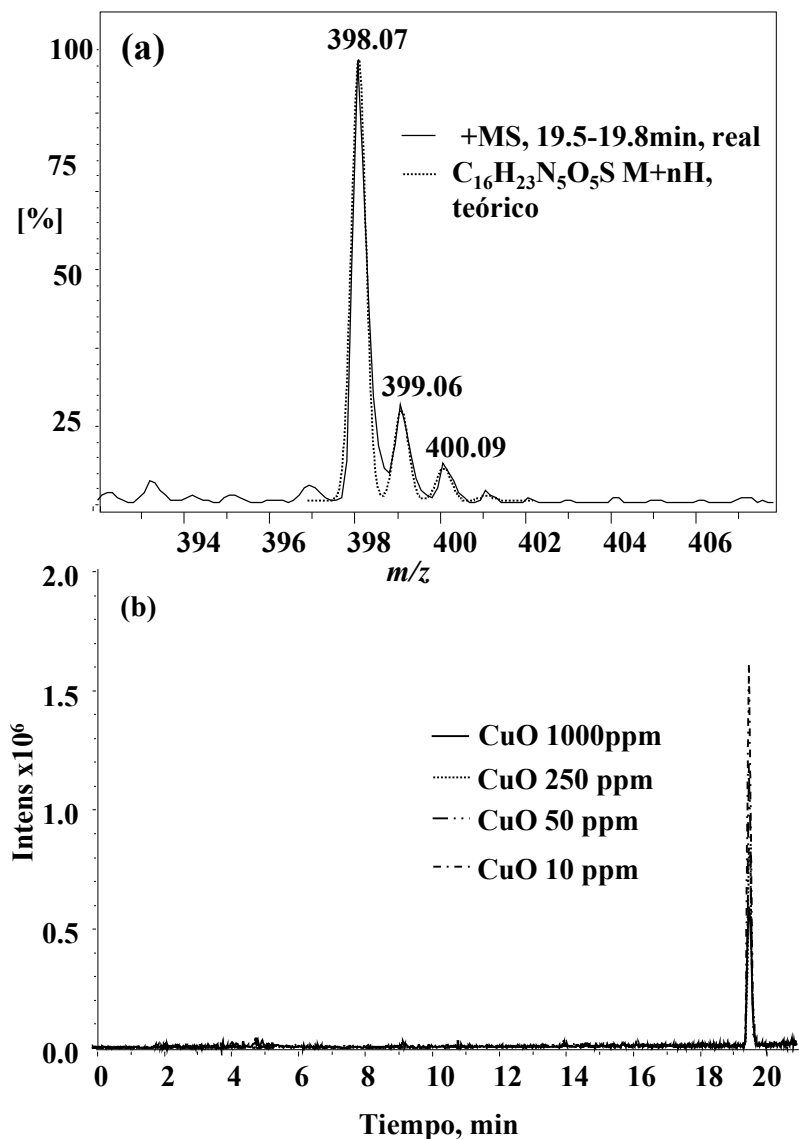


Figura 4.52 a- Comparación de patrón isotópico del nucleósido 34 (línea semicontinua) con su patrón teórico (línea sólida) para DNA de berros expuestos a CuO NP (250 mg L⁻¹); **b-** EIC para *m/z* de 398 (tipo de línea y concentración de cada exposición mostrado en la Figura).

Los experimentos y los análisis que se acaban de describir no son suficientes para la identificación contundente de los compuestos propuestos. Para completar esta tarea, es necesaria la determinación de masa exacta y confirmación con el uso de los estándares auténticos de compuestos de interés. En este trabajo se contó con una mezcla de estándares que cubrió solamente algunos de los nucleósidos modificados.

El análisis HPLC-ESI-MSⁿ en *full scan*, reveló la presencia de por lo menos 35 nucleósidos. Para facilitar la interpretación en la asignación de estos picos, la Tabla 4.22 resume información

concerniente a los fragmentos detectados durante el análisis de dichos nucleósidos provenientes de los hidrolizados de ácidos nucleicos de berros expuestos a CuO NPs (Figura 4.53a). La presencia de los nucleósidos con los números 2,4,5,7,8,9,11,13,14,15,17,18,19,21,23 y 24 (Figura 4.53b, Tabla 4.23), fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de MSⁿ de los que se cuenta con estándar. Los restantes, 1,3,6,10,12,16,20,22,25-35 se proponen sin tener certeza absoluta en base a la información que proporciona el procedimiento HPLC-ESI-ITMS y descrita anteriormente.

Tabla 4.22 Asignación de fragmentos detectados durante el análisis MS/MS

Producto MS/MS	Tipo de fragmento	Asignación
116	CNL	desoxirribosa
132	CNL	ribosa
146	CNL	metilribosa
194	CNL	desconocida, posible 3',5'-monofosfato cíclico de ribosa
112	<i>m/z</i>	citocina
113	<i>m/z</i>	uracilo
126	<i>m/z</i>	metilcitocina
127	<i>m/z</i>	timina
136	<i>m/z</i>	adenina
137	<i>m/z</i>	hipoxantina
150	<i>m/z</i>	metiladenina
152	<i>m/z</i>	guanina
164	<i>m/z</i>	dimetiladenina
166	<i>m/z</i>	metilguanina
168	<i>m/z</i>	8-hidroxi guanina
180	<i>m/z</i>	dimetilguanina
204	<i>m/z</i>	N ⁶ -isopenteniladenosina
210	<i>m/z</i>	5-(isopentenilaminometil)uracilo
220	<i>m/z</i>	N ⁶ -(cis-hidroxiisopentenil)adenina
266	<i>m/z</i>	2-metiltio-N ⁶ -(cis-hidroxiisopentenil) adenina
281	<i>m/z</i>	N ⁶ -treonilcarbamoiladenina

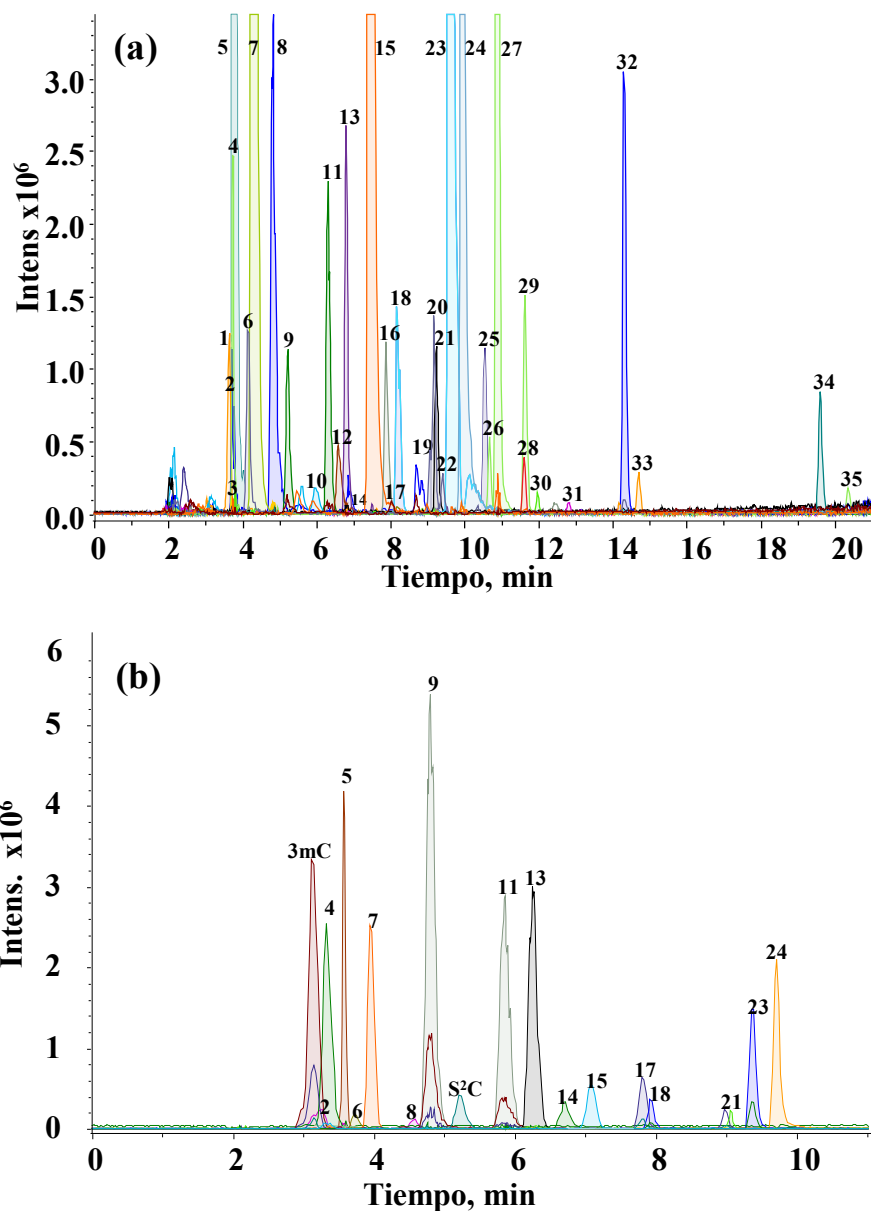
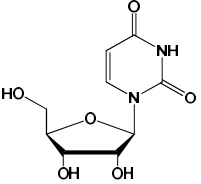
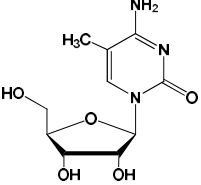
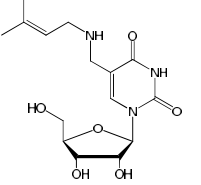
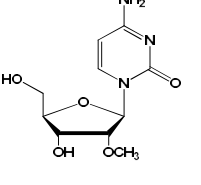
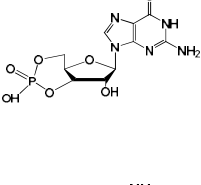
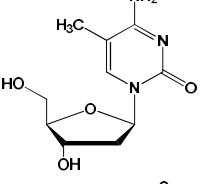
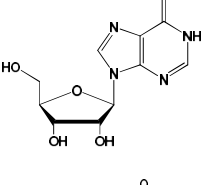
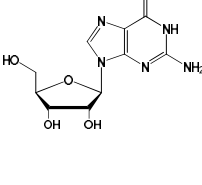


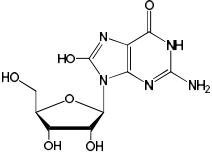
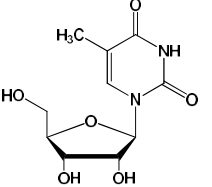
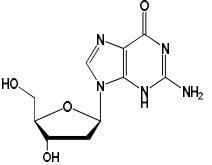
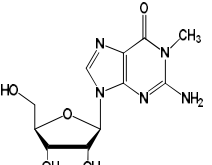
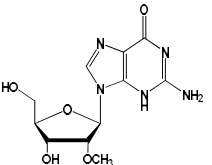
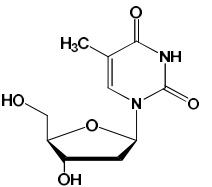
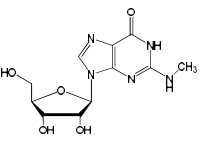
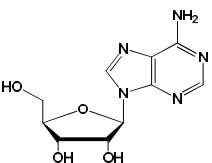
Figura 4.53 a- Cromatograma de valores m/z extraídos para el análisis HPLC-ESI-ITMS de hidrolizados de ácidos nucleicos extraídos de berros expuestos a CuO NPs (1000 mg L^{-1}). 1 306, 2 245, 3 247, 4 282, 5 487, 6 298, 7 455, 8 245, 9 515, 10 342, 11 515, 12 346, 13 483, 14 537, 15 284, 16 300, 17 259, 18 268, 19 298, 20 298, 21 243, 22 298, 23 268, 24 252, 25 312, 26 282, 27 282, 28 413, 29 282, 30 266, 31 427, 32 296, 33 352, 34 398, 35 336. El nombre de los nucleósidos asignados se presenta en la Tabla 4.23.

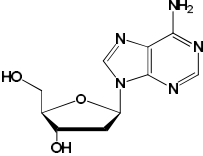
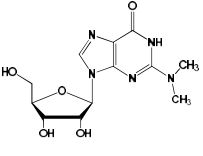
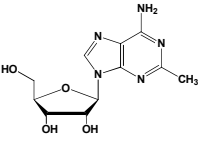
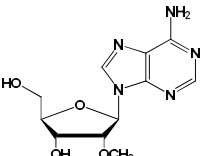
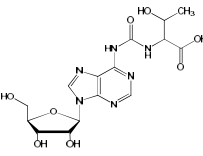
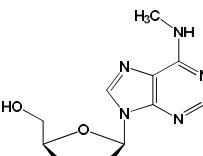
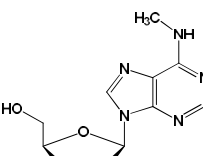
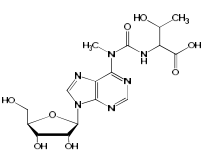
b- Cromatograma de valores m/z extraídos para una inyección de $5 \mu\text{L}$ de una mezcla de 18 estándares que contenía la siguiente concentración de nucleósidos: 3mC $258, 17.5 \text{ mg L}^{-1}$; 2 $245, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 4 $282, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 5 $487, 12.5 \text{ mg L}^{-1}$; 6 $298, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 7 $455, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 8 $245, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 9 $515, 25 \text{ mg L}^{-1}$; S²C $260, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 11 $515, 5 \text{ mg L}^{-1}$; 13 $483, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 14 $537, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 15 $284, 6.25 \text{ mg L}^{-1}$; 17 $259, 12.5 \text{ mg L}^{-1}$; 18 $268, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 21 $243, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 23 $268, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; 24 $252, 2.5 \text{ mg L}^{-1}$. El nombre de los nucleósidos se presenta en la Tabla 4.23.

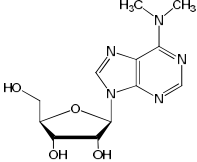
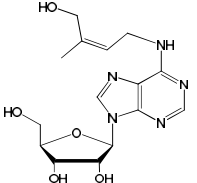
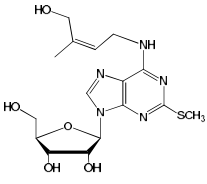
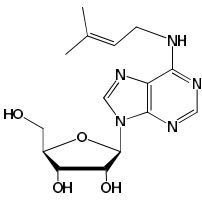
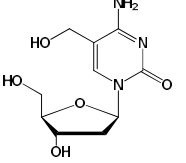
Tabla 4.23 Lista de los nucleósidos detectados mediante el procedimiento HPLC-ESI-ITMSⁿ y la información utilizada para proponer su identidad. Se presenta nombre, estructura, tiempos de retención con su respectivo porcentaje de desviación estándar relativa (RSD), valores *m/z* de (M+H⁺) y (2M+H⁺) en caso de la formación del homodímero, fragmento formado después de rompimiento por MS² así como su pérdida neutra contante (CNL).

# ^a	Nucleósido	Estructura	TR min (RSD, %)	M+H ⁺ (nominal)	2M+H ⁺	EIC	Fragmento MS/MS	CNL detectada
1	3',5'-monofosfato cíclico de citidina (cCMP) C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₇ P		3.68 (1.1)	306	---	306	112	194
2	pseudouridina (Ψ) C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆		3.76 (1.2)	245	489	245	113	132
3	dihidrouridina (D)		3.75 (1.5)	247	---	245	113	132
4	1-metiladenosina (m ¹ A) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄		3.78 (1.0)	282	---	282	150	132
5	citidina (C) C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅		3.79 (1.0)	244	487	487	112	132
6	7-metilguanosin a m ⁷ G C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅		4.18 (1.0)	298	---	298	166	132
7	2'-deoxicitidina (dC) C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄		4.35 (5.1)	228	455	455	112	116

8	uridina (U) C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆		4.87 (4.2)	245	489	245	113	132
9	5- metilcitolina (5mC) C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅		5.27 (1.5)	258	515	515	126	132
10	5- (isopentenilamin ometil)uridina (im5U) C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₆		6.02 (6.8)	342	---	342	210	132
11	2'-O- metilcitolina (Cm) C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅		6.34 (2.0)	258	515	515	112	146
12	3',5'- monofosfato cíclico de guanosina (cCMP)C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P		6.63 (2.9)	346	---	346	152	194
13	5-metil-2'- deoxicitidina (5mdC) C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₄		6.86 (5.3)	242	483	483	126	116
14	inosina (I) C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅		6.89 (7.2)	269	537	537	137	132
15	guanosina (G) C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅		7.50 (2.9)	284	487	284	152	132

16	8- hidroxiguanosi na (8OHG) C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₆		7.92 (2.5)	300	---	300	168	132
17	5-metiluridina (5mU) C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆		8.08 (2.5)	259	---	259	127	132
18	desoxiguanosi na (dG) C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄		8.21(3.5)	268	535	268	152	116
19	1- metilguanosi na (m ¹ G) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅		9.08 (1.7)	298	---	298	166	132
20	2'-O- metilguanosi na (Gm) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅		9.19 (1.0)	298	----	298	152	146
21	timidina (T) C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅		9.25 (0.6)	243	485	243	127	116
22	N ² - metilguanosi na (m ² G) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅		9.43 (1.2)	298	---	298	166	132
23	adenosina (A) C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄		9.62 (1.5)	268	---	268	136	132

24	2'- deoadenosina (dA) C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃		9.95 (1.0)	252	---	252	136	116
25	N ² ,N ² - dimetilguanosi na (m ² G) C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅		10.55 (1.2)	312	---	312	180	132
26	2- metiladenosina (m ² A) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄		10.68 (0.6)	282	----	282	150	132
27	2'-O- metiladenosina (Am) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄		10.90 (0.6)	282	-----	282	136	146
28	N ⁶ - treonilcarbamo iladenosina (t6A)		11.61 (2.5)	413	---	413	281	132
29	N ⁶ - metiladenosina (m ⁶ A) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄		11.63 (1.2)	282	----	282	150	132
30	N ⁶ -metil-2'- deoxyadenosina (m ⁶ dA) C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃		11.98 (1.7)	266	---	266	150	116
31	N ⁶ -metil-N ⁶ - treonilcarbamo iladenosina (m6t6A)		12.83 (1.5)	427	---	427	---	111

32	N ⁶ ,N ⁶ - dimetiladenosina (m ⁶ ₂ A) C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄		14.32 (1.5)	296	-----	296	164	132
33	N ⁶ -(cis- hidroxiisopentenil) adenosina (io ⁶ A) C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₅		14.70 (1.0)	352	-----	352	220	132
34	2-metilio-N ⁶ -(cis- hidroxiisopentenil) adenosina (msio ⁶ A) C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₅ S		19.59 (1.2)	398	----	398	266	132
35	N ⁶ - isopentenilade- nosina (i ⁶ A) C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₄		20.34 (0.6)	336	----	336	204	132
36	5-(Hidroximetil)- 2'-deoxicitidina (5hmdC) C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅ No detectada en plantas		4.54 (3.6)	258	515	515	142	116

^a Los nucleósidos con los números 2,4,5,7,8,9,11,13,14,15,17,18,19,21,23 y 24 (Figura 4.53), fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de MSⁿ de los que se cuenta con estándar. Los restantes 1,3,6,10,12,16,20,22,25-35 son propuestos en base al análisis de masas en tándem.

Efecto de NPs CuO sobre la abundancia relativa de modificaciones detectadas

El estudio por HPLC-ESI-ITMSⁿ de los hidrolizados de ácidos nucleicos permitió analizar las modificaciones de nucleósidos así como evaluar cambios de su abundancia en *L. sativum* en respuesta a la exposición de planta a diferentes concentraciones de nanopartículas de CuO. Para la mayoría de los nucleósidos se observó variación en función de la concentración de CuO NPs. A continuación se describirán algunas de ellas.

La 8-hidroxiguanosina, es producida por el daño oxidativo de ácidos nucleicos y es utilizada como biomarcador de estrés oxidativo. Se propone la presencia de este nucleósido en los hidrolizados de DNA, etiquetado como nucleósido 16 (Tabla 4.23) en base a sus fragmentos

obtenidos y comparación de padrón isotópico. En el caso de este compuesto, se observó un incremento de aproximadamente 8 veces en los hidrolizados de berros sometidos a las concentraciones mayores de CuO NPs (250 y 1000 mg L⁻¹) con respecto a las más bajas (10 y 50 mg L⁻¹), lo que confirma el estrés oxidativo inducido por CuO NPs en altas concentraciones (Figura 4.54).

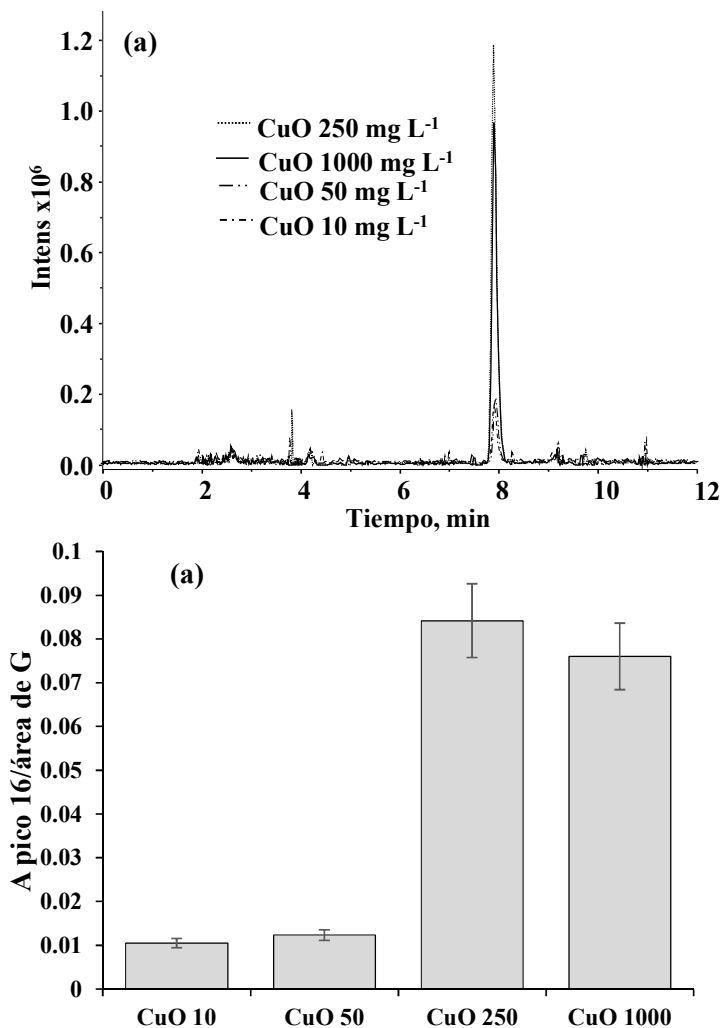


Figura 4.54 a- EIC para m/z 300 (nucleósido 16, Tabla 4.23) para diferentes condiciones de exposición de *L. sativum* a CuO NPs. **b-** Relación de área de pico 16 con respecto al área de guanosina dependiendo de la concentración de NPs CuO en el medio de cultivo.

Los nucleótidos cíclicos son de gran importancia biológica, estos han sido identificados como mensajeros secundarios en células eucariotas. De acuerdo al análisis de MS² de los compuestos 1 (m/z 306) y 12 (m/z 346, Figura 4.55a), se detectó una CNL de 194 Da para estos dos compuestos, lo que coincide con el fosfato ciclado con la ribosa. Así mismo, los fragmentos producidos

mostraron la presencia de un fragmento de m/z 112 Da característico de la citosina (Figura 4.55b) y m/z 152 característico de la guanina (Figura 4.55c) para los compuestos 1 y 12, respectivamente. Resulta de gran interés que la concentración de estos dos compuestos varía en función de la concentración de las nanopartículas. En el caso específico del compuesto 12 el área de pico fue de aproximadamente 30 veces mayor para 1000 mg L^{-1} con respecto a la de 10 mg L^{-1} de CuO NPs (Figura 4.55d), sin embargo es importante comentar que no se puede descartar la posibilidad de un falso positivo sin información adicional (identificación contundente) de estos dos compuestos.

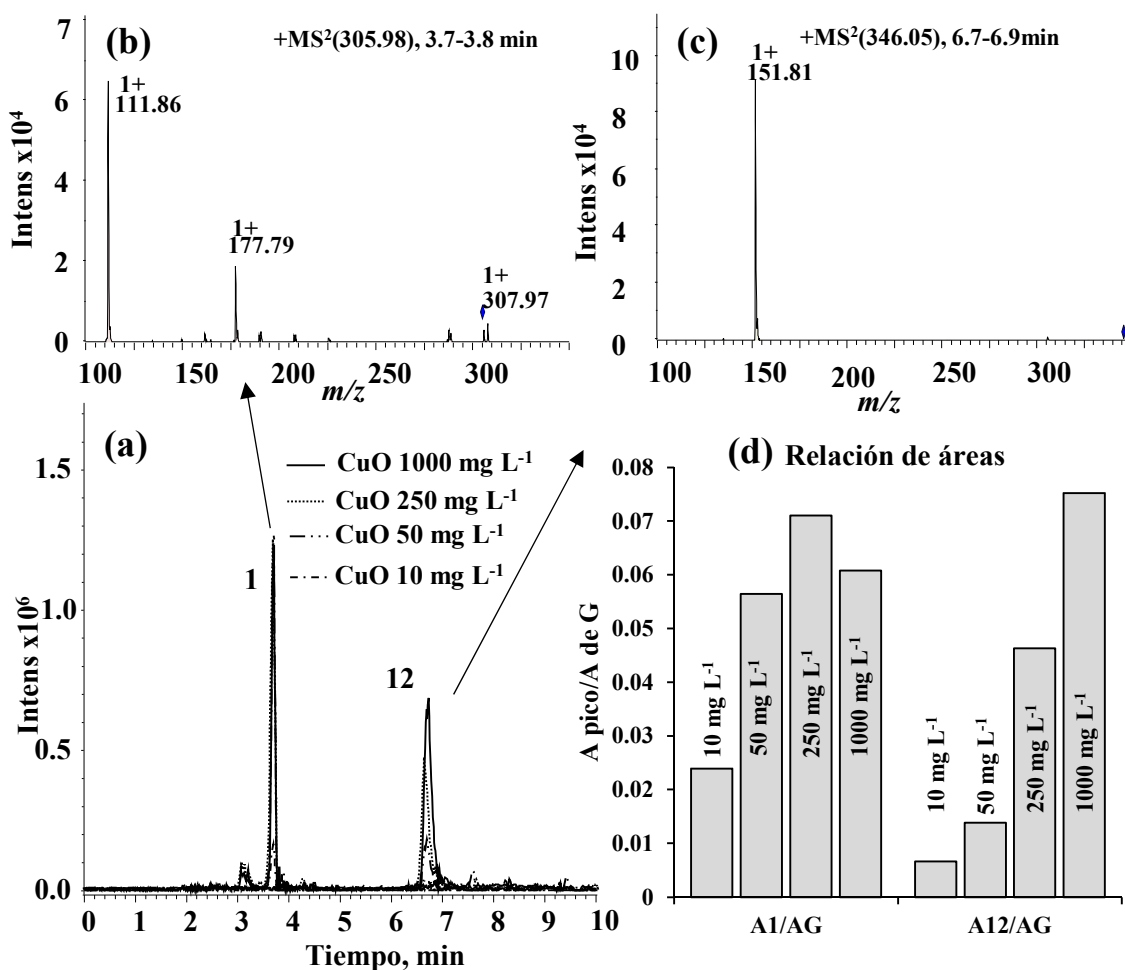


Figura 4.55 a- Cromatogramas de ion extraído para nucleósidos que presentan una CNL de 194. 1 m/z 306, 12 m/z 346. b- Espectro MS/MS del compuesto 1 para hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (1000 mg L^{-1}); c- Espectro MS/MS del compuesto 12 para hidrolizados de berros expuestos a CuO NP (1000 mg L^{-1}); d- Relación de áreas de picos 1 y 12 con respecto al área de G.

La gran mayoría de las modificaciones detectadas produjeron CNL de 132 Da, lo que indica su procedencia a partir del RNA. A excepción de los nucleósidos más abundantes provenientes en del DNA (dC, 5mdC, dG, T y dA), solo se detectó una modificación más (numerada como modificación número 30) en abundancia suficiente para producir la pérdida neutra de 116 Da (11.98 min), la cual resulta de gran interés (Figura 4.56). Los fragmentos de MS² aunado a la CNL y el tiempo de retención, indican la presencia de una adenosina metilada proveniente del DNA. Recientemente se demostró que la N⁶-metil-2'-deoxiadenosina (m⁶dA) es una modificación dinámica y regulada por un homólogo de las enzimas Tet y las enzimas demetilasas durante la embriogénesis en *Drosophila*. [23]. Se demostró que la m⁶dA marca los genes activos en *Chlamydomonas* y se encuentra presente en los nucleótidos ApT cercanos a los sitios del comienzo de la transcripción [24]. De esta manera se ha sugerido que m⁶dA actúa como una marca epigenética en la regulación de la expresión genética en células eucariotas [25].

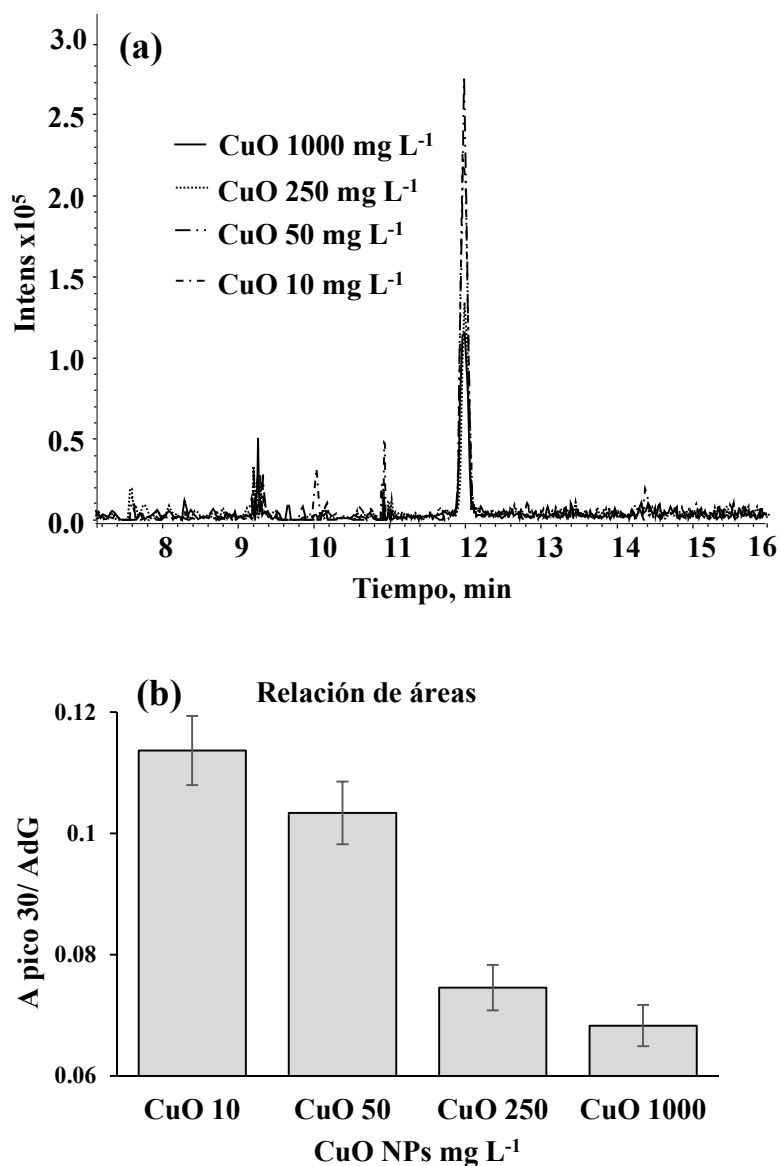


Figura 4.56 a- EIC para m/z 266 (nucleósido 30, Tabla 4.23) para diferentes condiciones de exposición de *L. sativum* a CuO NPs. **b-** Relación de área del pico 30 con respecto al área de dG.

Cabe señalar que algunas de las modificaciones detectadas presentan un indiscutible correlación entre la intensidad de su señal con respecto a la concentración de las CuO NPs, sin embargo y a pesar de una evidente homogeneidad en la cantidad de ácidos nucleicos extraídos de cada exposición, para cambios más sutiles, fue necesaria la normalización de las señales analíticas con la finalidad de comparar y confirmar la tendencia creciente o decreciente de algunos de los nucleósidos detectados en la muestra conforme aumenta la concentración de NPs CuO en medio.

Para esto, algunos de los nucleósidos detectados se normalizaron dividiendo el área de pico para el EIC de cada uno de ellos entre el área de pico de la guanosina (Figura 4.57), esto no cambió de manera significativa las tendencias de cambios en la intensidad de los nucleósidos modificados en función de la concentración de NPs CuO en el medio (muestras relativamente homogéneas) pero permite una comparación más puntual. De esta manera es importante destacar 3 tendencias observadas que eliminan la posibilidad de que la relación del cambio se deba a un artificio del análisis de datos o en la obtención de muestras: (1) compuestos que mostraron un evidente incremento al aumentar la concentración de NPs tal es el caso de 1, 12 y 16; (2) compuestos cuya intensidad disminuyó al incrementar la concentración de NPs como son Cm, 5mU, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 31, 33 y 34, es importante recalcar que todos ellos con excepción del compuesto 33 se propusieron como nucleósidos cuya modificación consiste en la metilación de su estructura (Tabla 4.23); (3) nucleósidos cuya abundancia no fue afectada por la concentración de NPs agregadas al medio como es el caso de Ψ , m¹A, m⁷G, 10, 26, 28, 32, 35.

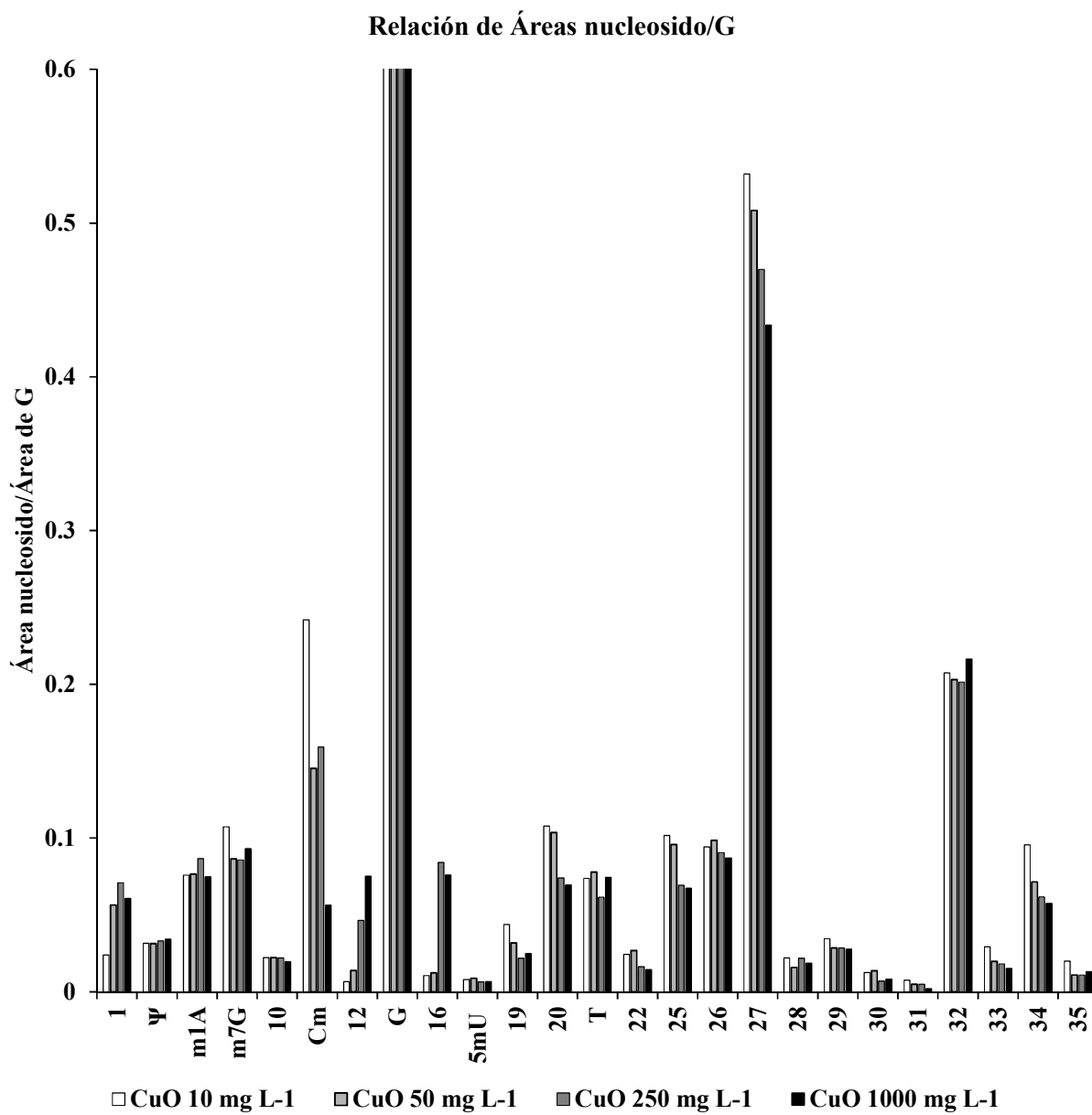


Figura 4.57 Relación de área de algunas modificaciones detectadas con respecto al área de G para cuatro diferentes concentraciones de CuO NPs. La *m/z* utilizada para cada EIC se muestra en la Tabla 4.23.

IV.5.5 Conclusiones

Se ha demostrado que el análisis por HPLC-ESI-ITMSⁿ de hidrolizados de ácidos nucleicos permitió detectar y parcialmente caracterizar las modificaciones de nucleósidos así como evaluar cambios de su abundancia en *L. sativum* en respuesta a la exposición de la planta a nanopartículas de CuO.

En la corrida cromatográfica se logró la detección de 35 nucleósidos. La información obtenida a partir de las CNL, los patrones de fragmentación MS² y MS³, los patrones isotópicos de los compuestos, la polaridad relativa así como la información bibliográfica de modificaciones reportadas, permitió proponer las estructuras de 19 nucleósidos de los que no se contó con estándares auténticos.

Los resultados obtenidos indican claramente la disminución en la abundancia de los compuestos metilados a partir de 10 mg L⁻¹ de CuO NPs, lo que sugiere una tendencia generalizada de la hipometilación causada por el estrés impuesto por las CuO NPs.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal del presente estudio ha sido avanzar en el conocimiento sobre las interacciones de algunos elementos metálicos y metaloides con ácidos nucleicos y su potencial interacción con metabolitos secundarios, mediante el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos. Para esto se trabajó con diferentes matrices provenientes de plantas como fue tequila, medios Hoagland gastados de cultivos hidropónicos de plantas, medios gastados durante inducción de la embriogénesis somática, extractos de compuestos fenólicos tanto de raíces como de partes aéreas de *L. Sativum*; así como hidrolizados de ácidos nucleicos provenientes de la misma planta. Las técnicas utilizadas para el desarrollo de los procedimientos fueron HPLC-DAD/FLD, GC-FID, ICP-MS, HPLC-ESI-ITMS. Para la adquisición y el tratamiento de datos se han empleado varios programas de software con fines de control de equipo, análisis estadístico, para búsqueda de compuestos y su confirmación mediante uso de bases de datos, fragmentación *in silico*, así como software enfocado al análisis cuantitativo. Los procedimientos desarrollados demostraron su utilidad en el análisis de muestras reales y nos arrojaron información nueva acerca del estrés ocasionado tanto por metales en su forma iónica como su participación en forma de nanopartículas; su influencia en algunas rutas metabólicas así como su papel en la modificación de ácidos nucleicos.

Las estancias de investigación realizadas permitieron la familiarización con diferentes técnicas complementarias a las técnicas analíticas, principalmente de biología estructural y celular tales como clonación, expresión de proteínas en células humanas y bacterias, purificación de proteínas usando cromatografía de afinidad, iónica y por exclusión de tamaño. Interacciones proteína-DNA usando termoforesis de microescala (MST) y titulaciones 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ monitoreadas por espectroscopia de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC).

Los resultados obtenidos en el desarrollo de este estudio han sido publicados en revistas indexadas, incluidas en Thompson Reuter Journal Citation Reports (mostrados en capítulo VII):

1. Armando Alcazar Magana, Kazimierz Wrobel, Alma Rosa Corrales Escobosa, Katarzyna Wrobel. Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress

under exposure to CuO nanoparticles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2015**, 29, 1-12. DOI: 10.1002/rcm.7440

2. Geovanny I. Nic-Can, Rosa M. Galaz-Ávalos, Celia De-la-Peña, Armando Alcazar-Magaña, Kazimierz Wrobel, Víctor M. Loyola-Vargas. Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus. *PLoS One* 06/**2015**; 10(6-6):e0126414.
3. Armando Alcazar Magana, Kazimierz Wrobel, Torres Elguera, Alma Rosa Corrales Escobosa, Katarzyna Wrobel. Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection. *Food Analytical Methods*. 19 August **2014**, Volume 8, Issue 4, pp 864-872.

Contribución en otros estudios:

4. Alma Rosa Corrales Escobosa, Armando Gomez Ojeda, Kazimierz Wrobel, Armando Alcazar Magana, Katarzyna Wrobel. Methylglyoxal is associated with bacteriostatic activity of high fructose agave syrups. *Food Chemistry*. Volume 165, 15 December **2014**, Pages 444–450.
5. Alcázar Magaña, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R. & Wrobel, K. (2014). Fast determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography without pre-column derivatization. *Acta Universitaria*, 24(NE-2), 16-22. doi: 10.15174/au.**2014**.717

Las conclusiones de este estudio y las contribuciones más novedosas del mismo se presentan a continuación.

1. Se modificó el procedimiento HPLC-DAD previamente desarrollado para el análisis de hidrolizados de ácidos nucleicos. Dicha modificación permitió la separación de los nucleósidos y del aducto dG-TCBQ en una sola corrida cromatográfica.
2. Se modificó el procedimiento HPLC-DAD/FLD previamente desarrollado para el análisis de compuestos fenólicos permitiendo así la búsqueda de más de 30 compuestos fenólicos presentes en exudados de berros expuestos a NPSe y Se(IV), lo que permitió correlacionar

la abundancia de diferentes compuestos provenientes de la ruta metabólica del ácido shikímico con el estrés inducido por el selenio.

3. Se desarrolló un procedimiento HPLC-ESI-ITMS utilizando EIC para el estudio de 34 compuestos fenólicos comúnmente presentes en muestras derivadas de plantas. Este procedimiento permitió la detección/cuantificación de 10 de estos compuestos en muestras de tequilas. Así mismo, se cuantificaron 8 de ellos en medio gastado de plantas de café sometidas a embriogénesis somática, lo que permitió realizar un estudio más profundo de la posible represión de la metilación causada por estos compuestos en plantas de café.
4. Se realizó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi de manera que se pueden extraer los ácidos nucleicos sin necesidad de usar tiocianato de guanidinio como agente caotrópico.
5. Se desarrolló un método HPLC-ESI-ITMS con monitoreo de reacciones múltiples para el análisis de nucleósidos. Una gran novedad es la cuantificación de citosinas provenientes de hidrolizados de ácidos nucleicos a partir de la formación de homodímeros de citidinas, lo que permitió no solo usar formiato de amonio sin necesidad de ajustar el pH, sino que además permitió el monitoreo de reacciones múltiples con dos transiciones aumentando la selectividad. Otra novedad de este análisis es que la energía de fragmentación utilizada (0.5 V de amplitud) para MRM permite romper los iones formados básicamente en dos fragmentos, ya sea de dímero a monómero o bien de monómero a nucleobase y azúcar; esto permite una relativa alta sensibilidad, ya que se evita la fragmentación excesiva de los iones mejorando aún más la selectividad, dado que un menor número de iones implica una disminución del ruido.
6. Se asignaron 19 nucleósidos presentes en extractos de ácidos nucleicos hidrolizados de plantas expuestas a CuO NPs de los que no se cuenta con estándar. Para dicha asignación, se realizó un estudio detallado de la información brindada por el procedimiento HPLC-ESI-ITMSⁿ cotejado con referencias bibliográficas y herramientas computacionales para comparación fragmentos con bases de datos.
7. Durante la estancia de investigación en el Departamento de Bioingeniería de la Universidad de Nagaoka, Japón; se aisló y expresó el gen *LigB* de *Sphingobium* sp. cepa SYK-6 para caracterizar la actividad de su proteína putativa sobre compuestos fenólicos derivados de

la madera. Así mismo, se creó una cepa mutante de la cual se interrumpió este gen para elucidar su actividad en el catabolismo de compuestos fenólicos.

8. Durante la estancia en la Universidad de Sídney, se construyó un plásmido que contenía el factor de transcripción *Myt1* del cual se logró por primera vez expresar y purificar su proteína (MyT1_{F4-F7}) que contiene 4 dedos de Zinc y está involucrada en el desarrollo del sistema nervioso. Dicha proteína actualmente se está caracterizando por cristalografía de rayos X en el mismo grupo de investigación.

En síntesis, los procedimientos desarrollados demostraron su confiabilidad para el estudio de compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas así como el análisis de ácidos nucleicos, ambos en respuesta al estrés abiótico ocasionado por xenobióticos tales como metales/metaloideos. Sin embargo, la información obtenida en este trabajo despierta más interrogantes. En el caso específico del análisis de nucleósidos, se puede apreciar la formación de aductos de citidinas con cobre a pesar de las etapas de precipitación/lavado de los ácidos nucleicos, lo que invita a explorar esta interacción. Así mismo, se advierte la presencia de m⁶dA y cGMP los cuales, de confirmarse, son de gran interés ya que están involucrados en importantes procesos de regulación biológica. En cuanto al selenio, queda por investigar el posible efecto de este elemento sobre la transformación de los compuestos fenólicos en la ruta del ácido shikímico y su posible asociación con la metilación del ADN.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Phillips, D.H., *Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues*. Carcinogenesis, 2002. **23**(12): p. 1979-2004.
2. Alexandrov, A., et al., *Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications*. Molecular Cell, 2006. **21**(1): p. 87-96.
3. Pardi, N., et al., *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides*. Methods Mol Biol, 2013. **969**: p. 29-42.
4. Sylvers, L.A., et al., *A 2-Thiouridine Derivative in Transfer Rna(Glu) Is a Positive Determinant for Aminoacylation by Escherichia-Coli Glutamyl-Transfer Rna-Synthetase*. Biochemistry, 1993. **32**(15): p. 3836-3841.
5. Henderson, I.R. and S.E. Jacobsen, *Epigenetic inheritance in plants*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 418-24.
6. Burklew, C.E., et al., *Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (Nicotiana tabacum)*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e34783.
7. Li, S., et al., *Assessment of nanomaterial cytotoxicity with SOLiD sequencing-based microRNA expression profiling*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 9021-30.
8. Hussain, S., et al., *Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes*. ACS Nano, 2012. **6**(7): p. 5820-9.
9. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 781-783.
10. Wolffe, A.P. and M.A. Matzke, *Epigenetics: regulation through repression*. Science, 1999. **286**(5439): p. 481-6.
11. Russell, D.W. and R.K. Hirata, *The detection of extremely rare DNA modifications. Methylation in dam- and hsd- Escherichia coli strains*. J Biol Chem, 1989. **264**(18): p. 10787-94.
12. McCloskey, J.A., et al., *Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic Methanococcales*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(22): p. 4699-706.
13. Wang, L., et al., *Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(11): p. 709-10.
14. Delcuve, G.P., M. Rastegar, and J.R. Davie, *Epigenetic control*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 243-50.
15. Fraga, M.F. and M. Esteller, **DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications**. BioTechniques, 2002. **33**: p. 632-649.
16. Dahl, C. and P. Guldborg, *DNA methylation analysis techniques*. Biogerontology, 2003. **4**: p. 233-250.
17. Vucic, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *Epigenetics of cancer progression*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(2): p. 215-34.
18. Ho, S.M. and W.Y. Tang, *Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases*. Reprod Toxicol, 2007. **23**(3): p. 267-82.

19. Su, Z., L. Han, and Z. Zhao, *Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes: new insights from single base-resolution DNA methylomes*. Epigenetics, 2011. **6**(2): p. 134-40.
20. Zhang, M., et al., *DNA cytosine methylation in plant development*. J Genet Genomics, 2010. **37**: p. 1-12.
21. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
22. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
23. Zhang, G., et al., *N6-methyladenine DNA modification in Drosophila*. Cell, 2015. **161**(4): p. 893-906.
24. Fu, Y., et al., *N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in chlamydomonas*. Cell, 2015. **161**(4): p. 879-92.
25. Summerer, D., *N(6) -Methyladenine: A Potential Epigenetic Mark in Eukaryotic Genomes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(37): p. 10714-6.
26. Gustilo, E.M., F.A. Vendeix, and P.F. Agris, *tRNA's modifications bring order to gene expression*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(2): p. 134-40.
27. Agris, P.F., *Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications*. EMBO Rep, 2008. **9**(7): p. 629-35.
28. Agris, P.F., F.A. Vendeix, and W.D. Graham, *tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification*. J Mol Biol, 2007. **366**(1): p. 1-13.
29. Nishimura, S., *[Modified nucleosides in tRNA: its structure, biosynthesis and function (author's transl)]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1977. **22 Spec No**(7): p. 922-30.
30. Mattick, J.S., et al., *RNA regulation of epigenetic processes*. Bioessays, 2009. **31**(1): p. 51-9.
31. Becker, M., et al., *Pmt1, a Dnmt2 homolog in Schizosaccharomyces pombe, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(22): p. 11648-58.
32. Motorin, Y., F. Lyko, and M. Helm, *5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(5): p. 1415-30.
33. Rodriguez-Dorantes, M., et al., *[DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]*. Rev Invest Clin, 2004. **56**(1): p. 56-71.
34. Gronbaek, K., c. Hohter, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. APMIS, 2007. **115**: p. 1039–1059.
35. Mohn, F. and D. Schubeler, *Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation*. Trends Genet, 2009. **25**(3): p. 129-36.
36. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. Can Med Assoc J, 2006. **174**: p. 341-348.
37. Shen, L., et al., *Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters*. PLoS Genet, 2007. **3**(10): p. 2023-36.
38. Zhang, X., et al., *Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1189-201.
39. Miura, A., et al., *An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites*. EMBO J, 2009. **28**(8): p. 1078-86.
40. Van der Graaf, A., et al., *Rate, spectrum, and evolutionary dynamics of spontaneous epimutations*. PNAS, 2015: p. doi:10.1073/pnas.142454112.

41. Niederhuth, C.E. and R.J. Schmitz, *Covering your bases: inheritance of DNA methylation in plant genomes*. Mol Plant, 2014. **7**: p. 472-480.
42. Vaillant, I. and J. Paszkowski, *Role of histone and DNA methylation in gene regulation*. Curr Opin Plant Biol, 2007. **10**(5): p. 528-33.
43. Fuks, F., *DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 490-5.
44. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**: p. 481-486.
45. Ziech, D., et al., *The role of epigenetics in environmental and occupational carcinogenesis*. Chem Biol Interact, 2010. **188**(2): p. 340-9.
46. Herzeg, Z., *Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors*. Mutagenesis, 2007. **22**: p. 91-103.
47. Salmikow, K. and A. Zhitkovich, *Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic and chromium*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**: p. 28-44.
48. Gadhia, S.R., A.R. Calabro, and F.A. Barile, *Trace metals alter DNA repair and histone modification pathways concurrently in mouse embryonic stem cells*. Toxicol Lett, 2012. **212**(2): p. 169-79.
49. Broday, L., J. Cai, and M. Costa, *Nickel enhances telomeric silencing in Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res, 1999. **440**(2): p. 121-30.
50. Maldonado Santoyo, M., et al., *Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments*. Environ Pollut, 2011. **159**: p. 2387-2392.
51. Yanez Barrientos, E., et al., *Application of reversed phase high performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in Lepidium sativum: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV)*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**: p. 2397-2404.
52. Ou, X., et al., *Transgenerational inheritance of modified DNA methylation patterns and enhanced tolerance induced by heavy metal stress in rice (Oryza sativa L.)*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e41143.
53. Wang, B., et al., *Cadmium and its epigenetic effects*. Curr Med Chem, 2012. **19**(16): p. 2611-20.
54. Sutherland, J.E. and M. Costa, *Epigenetics and the environment*. Ann NY Acad Sci, 2003. **983**: p. 151-160.
55. Johnson, I.T. and N.J. Belshaw, *Environment, diet and CpG island methylation: Epigenetics signals in gastrointestinal neoplasia*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**: p. 1346-1359.
56. Barros, S.P. and S. Offenbacher, *Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease*. J Dent Res, 2009. **88**(5): p. 400-8.
57. Ferguson, L.R., N. Karunasinghe, and M. Philpott, *Epigenetic events and protection from colon cancer in New Zealand*. Environ Mol Mutagen, 2004. **44**: p. 36-43.
58. Hussain, S., et al., *Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount*. Toxicology, 2009. **260**(1-3): p. 142-9.
59. Stocco, A., et al., *Epigenetic effects of nano-sized materials*. Toxicology, 2012.

60. Gong, C., et al., *SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **397**(3): p. 397-400.
61. Gong, C., et al., *Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO₂-induced decrease of PARP-1 mRNA expression*. *Toxicol Lett*, 2012. **209**(3): p. 264-9.
62. Choi, A.O., et al., *Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells*. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(3): p. 291-302.
63. Halappanavar, S., et al., *Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study*. *Environ Mol Mutagen*, 2011. **52**(6): p. 425-39.
64. Li, S., et al., *MicroRNAs as participants in cytotoxicity of CdTe quantum dots in NIH/3T3 cells*. *Biomaterials*, 2011. **32**(15): p. 3807-14.
65. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. *FASEB J*, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
66. Alarifi, S., et al., *Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles*. *Int J Nanomedicine*, 2013. **8**: p. 983-93.
67. Peng, H. and J. Zhang, *Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding*. *Progress in Natural Science-Materials International*, 2009. **19**(9): p. 1037-1045.
68. Akimoto, K., et al., *Epigenetic inheritance in rice plants*. *Ann Bot*, 2007. **100**(2): p. 205-17.
69. Borsani, O., <http://www.fagro.edu.uy/~fisveg/docencia/curso%20fisioveg/Materiales%20teoricos/EstrasAbioticoFisio.pdf>.
70. Krasensky, J. and C. Jonak, *Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks*. *Journal of Experimental Botany*, 2012. **63**(4): p. 1593-1608.
71. Bogeat-Triboulot, M.B., et al., *Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in Populus euphratica, a poplar growing in arid regions*. *Plant Physiol*, 2007. **143**(2): p. 876-92.
72. Mahajan, S. and N. Tuteja, *Cold, salinity and drought stresses: an overview*. *Arch Biochem Biophys*, 2005. **444**(2): p. 139-58.
73. Murchie EH, H.P., *Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference*. *Plant Cell Environ*, 1997. **20**: p. 438-48.
74. Grusak, M.A., *Plant Macro- and Micronutrient Minerals*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
75. DAVIS, P.H.T.B.a.R.D., *UPPER CRITICAL LEVELS OF TOXIC ELEMENTS IN PLANTS*. *New Phytol*, 1977. **79**: p. 95-106.
76. Kosova, K., et al., *Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response*. *J Proteomics*, 2011. **74**(8): p. 1301-22.
77. Wrobel, K., et al., *HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves - a potential dietary source of Se-methylselenocysteine*. *Food Chem*, 2004. **86**: p. 617-623.
78. Ibrahim, G., et al., *Stability constants of potent cytotoxic copper(II) complexes with furan semicarbazones in ethanolic solutions*. *J Inorg Biochem*, 2000. **81**(1-2): p. 29-34.

79. Rauser, W.E., *Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins*. Cell Biochem Biophys, 1999. **31**(1): p. 19-48.
80. Ray, P.C., H. Yu, and P.P. Fu, *Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs*. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009. **27**(1): p. 1-35.
81. Peng, D., et al., *Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity*. J Inorg Biochem, 2007. **101**(10): p. 1457-63.
82. Chang, Y.N., et al., *The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles*. Materials, 2012. **5**(12): p. 2850-2871.
83. Nations, S., et al., *Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on Xenopus laevis*. Chemosphere, 2011. **83**(8): p. 1053-1061.
84. Shaw, A.K. and Z. Hossain, *Impact of nano-CuO stress on rice (Oryza sativa L.) seedlings*. Chemosphere, 2013. **93**(6): p. 906-15.
85. Gunalan, S., R. Sivaraj, and R. Venkatesh, *Aloe barbadensis Miller mediated green synthesis of mono-disperse copper oxide nanoparticles: Optical properties*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012. **97**: p. 1140-1144.
86. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
87. Xia, T., et al., *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. Nano Lett, 2006. **6**(8): p. 1794-807.
88. Halliwell, B., et al., *The characterization of antioxidants*. Food Chem Toxicol, 1995. **33**(7): p. 601-17.
89. Mittler, R., et al., *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(10): p. 490-8.
90. Gill, S.S. and N. Tuteja, *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. Plant Physiol Biochem, 2010. **48**(12): p. 909-30.
91. Nardi, S., et al., *Soil organic matter mobilization by root exudates*. Chemosphere, 2000. **41**(5): p. 653-8.
92. Hawes, M.C., et al., *The role of root border cells in plant defense*. Trends Plant Sci, 2000. **5**(3): p. 128-33.
93. Bais, H.P., et al., *The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms*. Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 233-66.
94. Walker, T.S., et al., *Root exudation and rhizosphere biology*. Plant Physiol, 2003. **132**(1): p. 44-51.
95. Chaparro, J.M., et al., *Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55731.
96. Flores, H.E., J.M. Vivanco, and V.M. Loyola-Vargas, *'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism*. Trends Plant Sci, 1999. **4**(6): p. 220-226.
97. Micallef, S.A., M.P. Shiaris, and A. Colon-Carmona, *Influence of Arabidopsis thaliana accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates*. J Exp Bot, 2009. **60**(6): p. 1729-42.

98. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev, 1998. **56**(11): p. 317-33.
99. Justin N. Kabera, E.S., Ally R. Mussa and Xin He, *Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2014. **2**: p. 377-392.
100. Link, A., F. Balaguer, and A. Goel, *Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1771-92.
101. Porrás-Loaiza A. P., L.-M.A., *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 2009. **3**(1): p. 121-134.
102. Sevgi, K., B. Tepe, and C. Sarikurkcu, *Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids*. Food Chem Toxicol, 2015. **77**: p. 12-21.
103. Sackmauerova-Veningerova, M., et al., *Identification of chlorinated phenols as degradation products of chlorinated pesticides in biological materials*. J Chromatogr, 1981. **205**(1): p. 194-8.
104. Lin, P.H., et al., *Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol*. Carcinogenesis, 2002. **23**(2): p. 365-9.
105. Vaidyanathan, V.G., P.W. Villalta, and S.J. Sturla, *Nucleobase-dependent reactivity of a quinone metabolite of pentachlorophenol*. Chem Res Toxicol, 2007. **20**(6): p. 913-9.
106. Nguyen, T.N., et al., *Characterization of a deoxyguanosine adduct of tetrachlorobenzoquinone: dichlorobenzoquinone-1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(11): p. 1770-6.
107. Dai, J., et al., *Role of phenoxyl radicals in DNA adduction by chlorophenol xenobiotics following peroxidase activation*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(4): p. 771-9.
108. Alcazar Magana, A., et al., *High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests*. Anal Biochem, 2008. **374**: p. 378-385.
109. Feng, R., C. Wei, and S. Tu, *The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses*. Environ Exp Bot, 2013. **87**: p. 58-68.
110. Winkel, L.H., et al., *Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review*. Nutrients, 2015. **7**(6): p. 4199-239.
111. Terry, N., et al., *Selenium in higher plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000. **51**: p. 401-432.
112. Yanez Barrientos, E., et al., *Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in Lepidium sativum*. J Mex Chem Soc, 2012. **56**(1): p. 1-7.
113. Torres Elguera, J.C., et al., *Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in Lepidium sativum*. Acta Physiol Plant, 2013. **35**: p. 431-441.
114. Gomez Ojeda, A., et al., *Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in Lepidium sativum*. Metallomics, 2013. **5**: p. 1254-1261.
115. Asmathunisha, N. and K. Kathiresan, *A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms*. Colloids Surf B Biointerfaces. **103**: p. 283-7.
116. Dhillon, G.S., et al., *Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications*. Crit Rev Biotechnol. **32**(1): p. 49-73.

117. Korbekandi, H., S. Irvani, and S. Abbasi, *Production of nanoparticles using organisms*. Crit Rev Biotechnol, 2009. **29**(4): p. 279-306.
118. Narayanan, K.B. and N. Sakthivel, *Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes*. Adv Colloid Interface Sci. **156**(1-2): p. 1-13.
119. Husen, A. and K.S. Siddiqi, *Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: characterization and application*. J Nanobiotechnology, 2014. **12**: p. 28.
120. Bajaj, M., S. Schmidt, and J. Winter, *Formation of Se (0) nanoparticles by Duganella sp. and Agrobacterium sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India*. Microb Cell Fact, 2012. **11**: p. 64.
121. Haghghi, M., R. Abolghasemi, and J.A.T. da Silva, *Low and high temperature stress affect the growth characteristics of tomato in hydroponic culture with Se and nano-Se amendment*. Scientia Horticulturae, 2014. **178**: p. 231-240.
122. Domokos-Szabolcsy, E., et al., *Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in Nicotinia tabacum*. Plant Growth Regulation, 2012. **68**(3): p. 525-531.
123. Zhang, Y., J. Wang, and L. Zhang, *Creation of highly stable selenium nanoparticles capped with hyperbranched polysaccharide in water*. Langmuir, 2010. **26**(22): p. 17617-23.
124. E, Y.B., et al., *Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in Lepidium sativum*. J. Mexican Chemical Society 2012(56): p. 1-7.
125. de Ascensao, A.R. and I.A. Dubery, *Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in Musa acuminata roots exposed to elicitors from Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. Phytochemistry, 2003. **63**(6): p. 679-86.
126. Corrales Escobosa, A.R., et al., *Effect of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici on the soil-to-root translocation of heavy metals in tomato plants susceptible and resistant to the fungus*. J Agric Food Chem, 2010. **58**: p. 12392-12398.
127. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Selenium speciation in low molecular weight fraction of Se-enriched yeasts by HPLC-ICP-MS: Detection of selenoadenosylmethionine*. J Anal At Spectrom, 2002. **17**(9): p. 1048-1054.
128. Causevic, A., et al., *DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines*. Plant Physiol Biochem, 2005. **43**(7): p. 681-91.
129. Lee, W.J. and B.T. Zhu, *Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols*. Carcinogenesis, 2006. **27**(2): p. 269-77.
130. Kohli, R.M. and L. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 2013. **502**: p. 472-479.
131. Yao, Q., et al., *Heterologous expression and purification of Arabidopsis Thaliana VIMI protein: in vitro evidence for its inability to recognize hydroxymethylcytosine, a rare base in Arabidopsis DNA*. Protein Expr Purif, 2012. **83**: p. 104-111.
132. Jang, H., et al., *Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**: p. 1067-1072.
133. Bai, B.X., et al., *Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 3984-3992.

134. Laghari, A.H., et al., *Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of Chenopodium album*. Food Chemistry, 2011. **126**(4): p. 1850-1855.
135. Luo, C.Y., et al., *Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 2697-2706.
136. Nixdorf, S.L. and I. Hermosin-Gutierrez, *Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity*. Analytica Chimica Acta, 2010. **659**(1-2): p. 208-215.
137. Sanz, M., et al., *LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (Fraxinus excelsior L. and F. americana L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage*. Journal of Mass Spectrometry, 2012. **47**(7): p. 905-918.
138. Wu, X.F., et al., *Simultaneous qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in Aloe barbadensis Mill by liquid chromatography-mass spectrometry-ion trap-time-of-flight and high performance liquid chromatography-diode array detector*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **80**: p. 94-106.
139. Sun, J.Q., et al., *Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries*. Molecules, 2007. **12**(3): p. 679-693.
140. Khanam, U.K.S., et al., *Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(4): p. 979-987.
141. Bertin, R.L., et al., *Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in Sarcocornia ambigua (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS*. Food Research International, 2014. **55**: p. 404-411.
142. Gratacos-Cubarsi, M., et al., *Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in Brassica oleracea L. var. botrytis*. Food Chemistry, 2010. **121**(1): p. 257-263.
143. Sentandreu, E., M. Cerdan-Calero, and J.M. Sendra, *Phenolic profile characterization of pomegranate (Punica granatum) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer*. Journal of Food Composition and Analysis, 2013. **30**(1): p. 32-40.
144. Nic-Can, G.I., et al., *Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126414.
145. Santos-Zea L, L.-D.A., Cortes-Ceballos E, Gutiérrez-Urbe JA, *Agave (Agave spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds*. Curr Bioact Comp, 2012. **8**: p. 218-231.
146. Carreon-Alvarez, A., et al., *Determination of Cu in tequila by anodic stripping voltammetry*. Analytical Letters, 2008. **41**(3): p. 469-477.
147. Lachenmeier, D.W., et al., *Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(11): p. 3911-3915.
148. Munoz-Munoz, A.C., et al., *Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila*. Journal of Chromatography A, 2008. **1213**(2): p. 218-223.

149. Pena-Alvarez, A., et al., *Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2006. **1134**(1-2): p. 291-7.
150. Vallejo-Cordoba, B., A.F. Gonzalez-Cordova, and M. del Carmen Estrada-Montoya, *Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(18): p. 5567-5571.
151. Flores, C.R., et al., *ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila*. European Food Research and Technology, 2009. **228**(6): p. 951-958.
152. Ben Hamissa, A.M., et al., *Phenolics extraction from Agave americana (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor*. Food and Bioproducts Processing, 2012. **90**(C1): p. 17-21.
153. Ahumada-Santos, Y.P., et al., *Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico*. Industrial Crops and Products, 2013. **49**: p. 143-149.
154. Almaraz-Abarca, N., et al., *Variability of the Foliar Phenol Profiles of the Agave Victoriae-Reginae Complex (Agavaceae)*. Botanical Sciences, 2013. **91**(3): p. 295-306.
155. Morales-Serna JA, J.A., Estrada-Reyes R, Marquez C, Cárdenas J, SalmónM, *Homoisoflavanones from Agave tequilana Weber*. Molecules, 2010. **15**: p. 295–3301.
156. Nogueira, A., et al., *Effect of Alcoholic Fermentation in the Content of Phenolic Compounds in Cider Processing*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2008. **51**(5): p. 1025-1032.
157. Avila-Reyes, J.A., et al., *Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels*. Food Research International, 2010. **43**(1): p. 296-300.
158. Cerezo, A.B., et al., *Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing*. Journal of Food Composition and Analysis, 2010. **23**(2): p. 175-184.
159. Zimmerman, J.L., *Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants*. Plant Cell, 1993. **5**(10): p. 1411-1423.
160. Higashi, K., et al., *Inhibitory conditioning for carrot somatic embryogenesis in high cell-density cultures*. Plant Cell Reports, 1998. **18**(1-2): p. 2-6.
161. Fini, L., et al., *Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells*. Journal of Nutrition, 2007. **137**(12): p. 2622-2628.
162. Fu, C.H., et al., *Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term Taxus cell culture*. Plant Cell Reports, 2012. **31**(7): p. 1321-1331.
163. Schneider-Stock, R., et al., *Epigenetic mechanisms of plant-derived anticancer drugs*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2012. **17**: p. 129-173.
164. Leljok-Levanic, D., et al., *Somatic embryogenesis in pumpkin (Cucurbita pepo L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds*. Journal of Plant Physiology, 2004. **161**(2): p. 229-236.
165. Loschiavo, F., et al., *DNA Methylation of Embryogenic Carrot Cell-Cultures and Its Variations as Caused by Mutation, Differentiation, Hormones and Hypomethylating Drugs*. Theoretical and Applied Genetics, 1989. **77**(3): p. 325-331.

166. Viejo, M., et al., *DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in Castanea sativa Miller*. Sex Plant Reprod, 2010. **23**(4): p. 315-23.
167. Umehara, M., et al., *Inhibitory Factor(s) of Somatic Embryogenesis Regulated Suspensor Differentiation in Suspension Culture of Japanese Larch(Larix leptolepis GORDON)*. Plant Biotechnology, 2004. **21**(2): p. 87-94.
168. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
169. Mytych, J. and M. Wnuk, *Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells*. J Biomater Nanobiotechnol, 2013. **4**: p. 53-63.
170. Peralta-Videa, J.R., et al., *Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010*. J Hazard Mater, 2011. **186**: p. 1-15.
171. Chibber, S., S.A. Ansari, and R. Satar, *New vision to CuO, ZnO and TiO2 nanoparticles: their outcome and effects*. J Nanopart Res, 2013. **15**: p. 1492.
172. Shyamasundar, S., et al., *Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity*. Epigenomics, 2015. **7**: p. 395-411
173. Ruffini Gastiglione, M. and R. Cremonini, *Nanoparticles and higher plants*. Caryologia, 2009. **62**: p. 161-165.
174. Shaw, A.K. and Z. Hossain, *Impact of nano-CuO stress on rice (Oryza sativa L.) seedlings*. Chemosphere, 2013. **93**: p. 906–915.
175. Fröhlich, E., *Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles*. Curr Drug Metab, 2013. **14**: p. 976-988.
176. Stoccoroa, A., et al., *Epigenetic effects of nano-sized materials*. Toxicology, 2013. **313**: p. 3-14.
177. Singh, N., et al., *Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**: p. 3891-3894.
178. Lu, X., et al., *Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome*. Nanotoxicology, 2015. **doi:10.3109/17435390.2015.1025115**.
179. Ghosh, M., et al., *MWCNT uptake in Allium cepa root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation*. Mutat Res, 2015. **774**: p. 49–58.
180. Atha, D.H., et al., *Copper oxide nanoparticles mediated DNA damage in terrestrial plant models*. Environ Sci Technol, 2012. **46**: p. 1819-1827.
181. Zhu, J.K., *Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 143-166.
182. Castel, S.E. and R.A. Martienssen, *RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond*. Nat Rev Genet, 2013. **14**: p. 100-112.
183. Cantara, W.A., et al., *The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update*. Nucl Acids Res, 2011. **39**: p. D195–D201.
184. Motorin, Y., F. Lyko, and M. Helm, *5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions*. Nucl Acids Res, 2010. **38**: p. 1415-1430.
185. Squires, J.E., et al., *Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA*. Nucl Acids Res, 2012. **doi:10.1093/nar/gks144**.
186. Mattick, J.S., et al., *RNA regulation of epigenetic processes*. BioEssays, 2009. **31**: p. 51–59.

187. Peng, C., et al., *Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (Oryza sativa L.) plants*. Environ Pollut, 2015. **197**: p. 99-107.
188. Shi, J., et al., *Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant Elsholtzia splendens*. Nanotoxicology, 2014. **8**: p. 179-188.
189. Ivask, A., et al., *Mechanism of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review*. Nanotoxicology, 2014. **8**: p. 57-71.
190. Chang, Y.N., et al., *The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles*. Materials, 2012. **5**: p. 2850-2871.
191. Dhingra, T., K. Mittal, and G.S. Sarma, *Analytical techniques for DNA methylation- an overview*. Curr Pharm Anal, 2014. **10**: p. 71-85.
192. Liu, J., L.B. Hesson, and R.L. Ward, *Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the measurement of global DNA methylation and hydroxymethylation*. J Proteomics Bioinform, 2013. **S2-005**: p. DOI:10.4172/jpb.S2-005.
193. Song, L., et al., *Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2005. **77**: p. 504-510.
194. Kouidou, S., L. Kovatsi, and A. Iannou, *Seeking the 5th base of DNA using chromatographic methods of analysis*. Curr Org Chem, 2010. **14**: p. 2268-2281.
195. Yang, I., et al., *Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status*. Anal Biochem, 2011. **409**: p. 138-143.
196. Rozhon, W., et al., *Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2008. **375**: p. 354-360.
197. Zhang, J.J., et al., *Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2011. **413**: p. 164-170
198. Wang, X., et al., *Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms*. J Chromatogr B, 2011. **879**: p. 1647-1652.
199. Li, X. and A.A. Franke, *High-throughput and cost-effective global DNA methylation assay by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2011. **58-63**: p. 58-63.
200. Zambonin, C.G. and F. Palmisano, *Electrospray ionization mass spectrometry of 5-methyl-2'-deoxycytidine and its determination in urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999. **13**: p. 2160-2165.
201. Han, S.Y. and H. Bin Oh, *Theoretical study of the ionic hydrogen bond in the isolated proton-bound dimer of cytosine*. Chemical Physics Letters, 2006. **432**(1-3): p. 269-274.
202. Han, S.Y. and H.B. Oh, *Theoretical study of the ionic hydrogen bond in the isolated proton-bound dimer of cytosine*. Chem Phys Lett, 2006. **432**: p. 269-274.
203. Armentano, D., G. De Munno, and L. Di Donna, *Self-assembling of cytosine nucleoside into triply-bound dimers in acid media. A comprehensive evaluation of proton-bound pyrimidine nucleosides by electrospray tandem mass spectrometry, X-rays diffractometry, and theoretical calculations*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**: p. 268-279.

204. Aljanabi, S.M. and I. Martinez, *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. Nucl Acids Res, 1997. **25**(22): p. 4692-4693.
205. Mitra, S.E., *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. 2003, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
206. Rossella, F., et al., *Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009. **23**(17): p. 2637-46.
207. Rozhon, W., et al., *Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2008. **375**(2): p. 354-60.
208. Le, T., et al., *A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples*. Anal Biochem, 2011. **412**: p. 203-209.
209. *ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1)*. http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. 2012 ICH.
210. Dimkpa, C.O., et al., *CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat*. 2012. **14**: p. 1125.
211. Lopez Torres, A., et al., *Selective derivatization of cytosine- and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for sub-microgram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection*. Anal Chem, 2011. **83**(20): p. 7999-8005.
212. Wrobel, K., et al., *Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation - A novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies*. J Chromatogr B, 2010. **878**: p. 609-614.
213. Aina, R., et al., *Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp*. Physiol Plant, 2004. **121**: p. 472-480.
214. Qiu, Z.H., et al., *Two-way effect of pesticides on zeatin riboside content in both rice leaves and roots*. Crop Protection, 2004. **23**(11): p. 1131-1136.
215. Esberg, B. and G.R. Bjork, *The methylthio group (ms²) of N⁶-(4-hydroxyisopentenyl)-2-methylthioadenosine (ms²iobA) present next to the anticodon contributes to the decoding efficiency of the tRNA*. J Bacteriol, 1995. **177**(8): p. 1967-75.
216. Masai, E., Y. Katayama, and M. Fukuda, *Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds*. Biosci Biotechnol Biochem, 2007. **71**(1): p. 1-15.
217. Singh, D. and S. Chen, *The white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium: conditions for the production of lignin-degrading enzymes*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **81**: p. 399-417.
218. Kamimura, N., et al., *Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in Comamonas sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(24): p. 8093-101.
219. Masai, E., et al., *Complete genome sequence of Sphingobium sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and monoaryls*. J Bacteriol, 2012. **194**(2): p. 534-5.
220. Kamimura, N., et al., *Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism*. J Bacteriol, 2012. **192**(13): p. 3394-405.

221. Kasai, D., et al., *Degradation of 3-O-methylgallate in Sphingomonas paucimobilis SYK-6 by pathways involving protocatechuate 4,5-dioxygenase*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **274**(2): p. 323-8.
222. Iyer, L.M., et al., *Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids*. Cell Cycle, 2009. **8**(11): p. 1698-710.
223. Tan, L. and Y.G. Shi, *Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease*. Development. **139**(11): p. 1895-902.
224. He, Y.F., et al., *Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA*. Science. **333**(6047): p. 1303-7.
225. Samson-Thibault, F., et al., *Profiling Cytosine Oxidation in DNA by LC-MS/MS*. Chem Res Toxicol.
226. Kriukiene, E., Z. Liutkeviciute, and S. Klimasauskas, *5-Hydroxymethylcytosine - the elusive epigenetic mark in mammalian DNA*. Chem Soc Rev.
227. Hoy, M.A., *Insect Molecular Genetics An Introduction to Principles and Applications*, Elsevier, Editor. 2013.
228. N.V. Bhagavan, C.-E.H., *Regulation of Gene Expression*, in *Essentials of Medical Biochemistry With Clinical Cases*, Elsevier, Editor. 2011.
229. Cadet, J. and J.R. Wagner, *TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine*. Mutat Res, 2014. **764-765**: p. 18-35.
230. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
231. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 597-610.
232. Gamsjaeger, R., et al., *Structural and biophysical analysis of the DNA binding properties of myelin transcription factor 1*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(8): p. 5158-67.
233. Kim, J.G., et al., *Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system*. Journal of neuroscience research, 1997. **50**(2): p. 272-90.
234. Romm, E., et al., *Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription*. Journal of neurochemistry, 2005. **93**(6): p. 1444-53.
235. Magana, A.A., et al., *High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests*. Anal Biochem, 2008. **374**(2): p. 378-85.
236. Torres, A.L., et al., *Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection*. Anal Chem, 2011. **83**(20): p. 7999-8005.
237. Wrobel, K., et al., *Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation--a novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(5-6): p. 609-14.
238. Wrobel, K., et al., *Ribonucleoside labeling with Os(VI): a methodological approach to evaluation of RNA methylation by HPLC-ICP-MS*. Metallomics, 2010. **2**(2): p. 140-6.
239. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(2): p. 481-6.

240. Santoyo, M.M., et al., *Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments*. Environ Pollut, 2011. **159**(10): p. 2387-92.
241. Yanez Barrientos, E., et al., *Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV)*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(7): p. 2397-404.
242. Marley, J., M. Lu, and C. Bracken, *A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins*. Journal of biomolecular NMR, 2001. **20**(1): p. 71-5.
243. Gamsjaeger, R., et al., *A structural analysis of DNA binding by myelin transcription factor 1 double zinc fingers*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(49): p. 35180-91.
244. Kageyama, R., T. Ohtsuka, and T. Kobayashi, *The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis*. Development, 2007. **134**(7): p. 1243-51.
245. Ruiz-Canada, C., D.J. Kelleher, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms*. Cell, 2009. **136**(2): p. 272-83.

CAPÍTULO VII. ANEXOS

ANEXO I. ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo con el objetivo particular 5, se realizaron dos estancias de investigación sobre temas afines a este proyecto de tesis.

La primera se llevó a cabo en el departamento de bioingeniería de la Universidad de Nagaoka, Japón en el semestre otoño-invierno 2012 bajo la dirección del profesor Eiji Masai cuyo grupo de investigación está especializado en el catabolismo de degradación de ligninas por diferentes tipos de *Sphingomonas*. En esta estancia se estudió la ruta catabólica del ácido siríngico y vanílico por *Sphingobium sp.* cepa SYK-6 en la que se encontró un gen homólogo de la familia de las dioxigenasas. La relevancia de esta estancia para el desarrollo de mi proyecto de doctorado se debe a la oportunidad de profundizar en el conocimiento de las rutas de síntesis y degradación de compuestos fenólicos *in vivo*.

La segunda estancia se llevó a cabo en la Escuela de Biociencias Moleculares de la Universidad de Sídney, Australia durante el segundo semestre del 2014 bajo la dirección del profesor Joel Mackay cuyo grupo de investigación está dedicado a estudiar el papel que juega la metilación del DNA en la actividad de los factores de transcripción. En particular, se estudió uno de estos factores de transcripción (Myt1) que contiene siete dedos de zinc.

A continuación se presentan los reportes de las dos estancias. Ambos reportes se elaboraron y entregaron al responsable en el extranjero, a las instancias financiadoras (Universidad de Guanajuato y CONACYT) y al Comité Tutorial en Inglés y en este mismo idioma se insertan al presente documento de tesis.

VII. 1 “Characterization of the *ligA* and *ligB* homologs, which encode a putative protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase of *Sphingobium* sp. strain SYK-6”

VII.1.1 Introduction

Lignin is one of the major components of woody plants and is the most abundant aromatic compound in nature. Therefore, lignin is expected as a new industrial material instead of fossil resources. However, because lignin forms a highly complicated three-dimensional network generated by random polymerization of phenylpropane units, the present use of lignin is limited to heat source by burning, and effective utilizations of it have not been established. On the other hand, a variety of soil microorganisms have been associated with lignin biodegradation. One potential practical use of lignin is the conversion of lignin into useful chemical compounds by microbial lignin degradation enzyme systems.

In nature, white rot fungi secreting phenol oxidases are assumed to be involved in the initial decomposition of native lignin, whereas bacteria play a main role in the mineralization of low-molecular-weight lignin-derived compounds in soil [216, 217]. Bacterial enzymatic systems are able to specifically degrade lignin-derived compounds, and thus are useful to produce industrially valuable compounds from lignin. In the biotechnological approach, the use of suitable microorganisms and their genetic engineering aid the enhanced efficiency of lignin conversion into useful chemicals and provide environmentally friendly technologies. The elucidation of microbial functions in the catabolism of lignin-derived compounds is important not only for understanding of the process of carbon cycle on earth, but also for providing useful tools for the conversion of lignins into intermediate metabolites of industrial value.

Sphingobium sp. strain SYK-6 (NBRC 103272) is a unique bacterium capable of utilizing various types of lignin-derived biaryls and monoaryls as the sole source of carbon and energy [216]. Dr. Eiji Masai group in Nagaoka University of Technology, has extensively studied *Sphingobium* sp. strain SYK-6 as a bacterium for the degradation of lignin-derived aromatic compounds, including beta-aryl ether, biphenyl, phenylcoumaran, and diarylpropane (Figure 7.1) [218-220]. These compounds are degraded to vanillate or syringate, and further catabolized via the protocatechuate (PCA) 4,5-cleavage pathway or multiple 3-*O*-methylgallate (3MGA) catabolic

pathways. The PCA 4,5-dioxygenase gene, *ligAB* is essential for the conversion of PCA and is also involved in the 3MGA catabolic pathways, therefore this gene is important for the degradation of lignin-derived aromatic compounds in SYK-6. The goal of the present proposal is to contribute to this research by characterizing newly found two gene homologs encoding a putative PCA 4,5-dioxygenase.

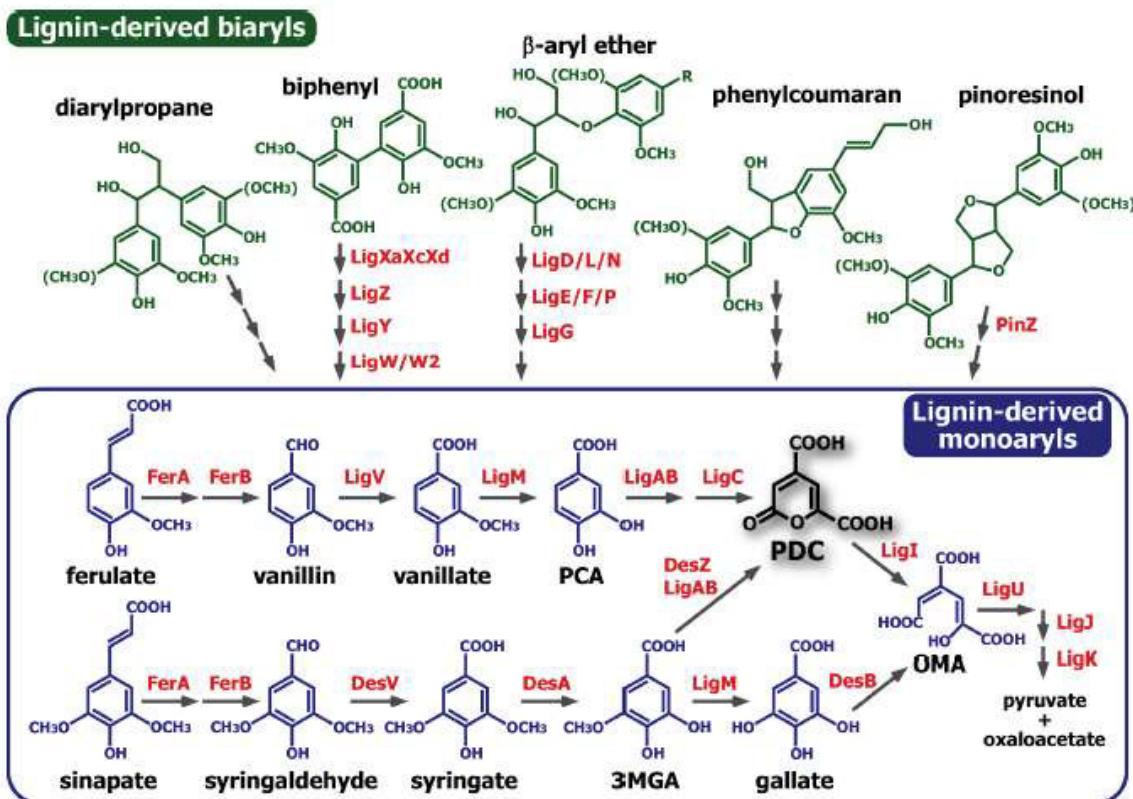


Figure 7.1 Catabolic pathway for the degradation of lignin-derived aromatics by *Sphingobium* sp. strain SYK-6 (Laboratory of Microbial Metabolic Engineering NUT).

Brief Background

Sphingobium sp. strain SYK-6 is able to grow on a wide variety of lignin-derived biaryls and monoaryls, and the catabolic genes for these compounds are useful for the production of industrially valuable lignin metabolites [219]. In this strain, lignin-derived biaryls are degraded to syringate and vanillate. Then syringate is converted to 3MGA, and vanillate is converted to PCA (Figure 7.2). This is a major utilization pathway for lignin-derived low molecular weight compounds, in which these aromatic compounds are further converted to pyruvate and

oxaloacetate [216, 220, 221]. The enzymes for the catabolism of PCA are encoded by the *ligJABC* and *ligKUI* operons (Figure 7.3). Transcription of these operons is activated by a regulator protein, LigR, in the presence of PCA or gallate (GA). In particular, the *ligAB* genes, which code for PCA 4,5-dioxygenase, are essential for the degradation of PCA. PCA 4,5-dioxygenase catalyzes the 4,5-cleavage of PCA by incorporating molecular oxygen. The enzyme of SYK-6 consists of small (alpha, LigA) and large (beta, LigB) subunits, and has an alpha2-beta2 heterotetrameric structure. LigAB exhibited significantly higher activity toward PCA, but it also showed relatively low activities toward GA and 3MGA. Furthermore, *ligAB* is also involved in the GA and 3MGA degradation in SYK-6.

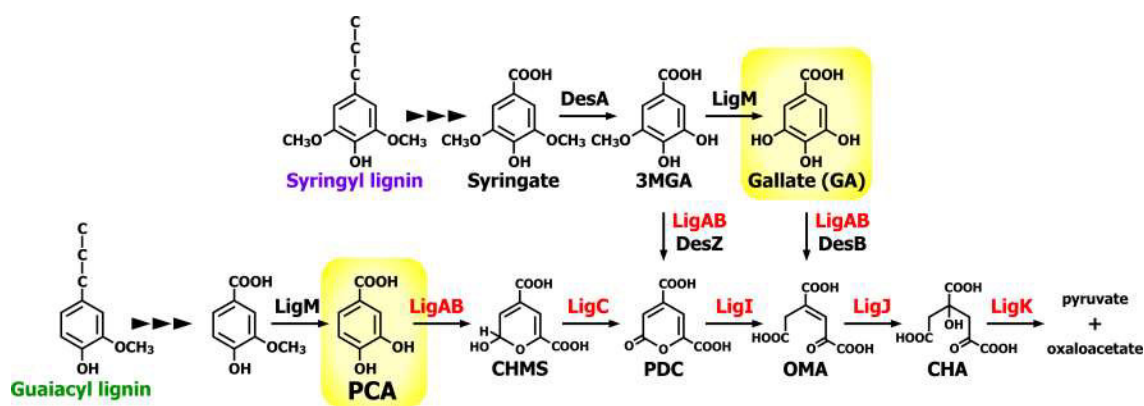


Figure 7.2 Catabolic pathways for the degradation of lignin-derived aromatics by *Sphingobium* sp. strain SYK-6 (Laboratory of Microbial Metabolic Engineering, NUT).

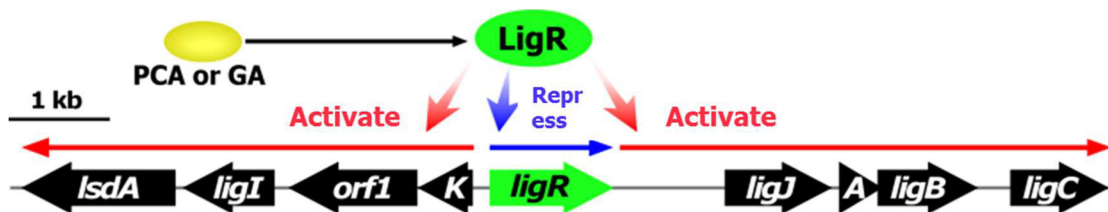


Figure 7.3 Transcriptional regulation of the PCA catabolic genes in SYK-6. Transcription of the *ligJABC* and *ligKUI* genes are activated by LigR in the presence of PCA or GA.

Recently, Masai et al. have found the presence of *ligA* and *ligB* homologs (*SLG_37530* and *SLG_37520*) in SYK-6 (Figure 7.4). *SLG_37530* and *SLG_37520* were highly expressed during the catabolism of vanillate and syringate but not expressed in the case of PCA (Table 7.1). These may suggest that *SLG_37530* and *SLG_37520* are involved in the catabolism of vanillate and

syringate. This study aims to characterize the function and role of *ligA* and *ligB* homologs.



Figure 7.4 Location of the PCA 4,5-dioxygenase gene (*ligAB*) homologs in the SYK-6 genome (left) and amino acid sequence identities of each homologous gene (right).

Table 7.1 Transcriptional induction of *ligAB* homolog.

Gene	Inducing Substrates		
	PCA	Vanillate	Syringate
LigA(139 aa)	25	4.2	6
LigB(302 aa)	22	3.8	4.7
SLG_37530(124 aa)	1.2	22	8.3
SLG_37520(286 aa)	1.6	26	9.1

Rationale

The research interest of Guanajuato group is focused on the development and applications of new analytical procedures, suitable for the determination of chemical species of environmental, industrial and biological relevance, in complex real-world matrices. The project for my PhD dissertation focuses on the characterization of nucleic acids interactions with metal/metalloids species, by means of development of analytical methodology. Consequently, this project is based on typical instrumental techniques as liquid and gas chromatography and mass spectrometry; however the familiarization with complementary biological and genetic techniques is considered necessary. It is now well established that metals/metalloids cause covalent modifications of DNA by variety of molecular mechanisms underlying epigenetic machinery.

In the frame of cooperation between Nagaoka University of Technology and Guanajuato

University, I have been accepted for three months stay in the Department of Bioengineering, specifically the research group headed by professor. Eiji Masai. The realization of the proposal presented here is important for my academic formation in the following aspects:

1. The experiments carried out for isolation, expression, and characterization of genes as well as for gene disruption will be an important training, particularly useful for the realization of my PhD project.
2. The realization of proposal would provide further insight into the lignin degradation with possible impact in biotechnology.
3. It has been established that dioxygenases are involved in the covalent modification of DNA with formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytosine [222-224]. This oxidative DNA modification has been reported as an epigenetic event occurring in the presence of redox-cycling metals [225, 226], for which the characterization of bacterial lignin-degrading dioxygenases is of potential interest in the context of my research project and may be an interesting topic of future collaboration with Dr. Masai group.

VII.1.2 Objective

The main goal of this proposal was to get a further insight into the vanillate and syringate catabolic system in *Sphingobium* sp. strain SYK-6 by the characterization of the newly found PCA 4,5-dioxygenase gene homologs.

VII.1.3 Materials and methods

Methodology

The realization of the project involves the following activities:

1. Isolation of the *ligA* and *ligB* homologs
2. Expression of the *ligA* and *ligB* homologs in *E. coli*
3. Characterization of the gene products of *ligA* and *ligB* homologs
4. Disruption of the *ligB* homolog in SYK-6
5. Characterization of a mutant of *ligB* homolog

6. Conclusion and Report

Chemicals

Syringate, vanillate, protocatechuate, gallate, caffeic acid, and catechol were purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co. (Tokyo, Japan) and 3MGA was from FluoroChem (Derbyshire, UK).

Bacterial strains and plasmids

Escherichia coli HB101, JM109 and NEB-10-BETA strains were used as cloning hosts. *E. coli* BL21(DE3), SoluBL21(DE3) and B121 Star(DE3) were used as host strains for protein expression. pET-16b and pAK405 were used as protein expression and gene disruption vectors, respectively.

Cloning of SLG_37530 and SLG_37520

To overexpress the *SLG_37530* and *SLG_37520* genes, the coding region was amplified by PCR using DNA Polymerase PrimeSTAR GXL (Takara, Otsu, Japan), SYK-6 genomic DNA as a template, and primers 37520-30F and 37520-30R. Primers 37520-30F (forward; GGATGCGTCCATATGAACATGACGGTCGACAC; underlined, NdeI site) and 37520-30R (reverse; GTCGGATCCAACATCAGAGCCCGCCG, GTC; underlined, BamHI site) were designed (Figure 7.5). The PCR conditions are described in Table 7.2. The PCR product was separated by agarose gel electrophoresis and the 1.3-kb amplified product was extracted from the gel using a QIAquick gel extraction kit. The PCR product and pET-16b were digested with NdeI and BamHI following by the ligation with Ligation high enzyme (Toyobo, Tokyo, Japan) to generate pET52030 (Figure 7.6).

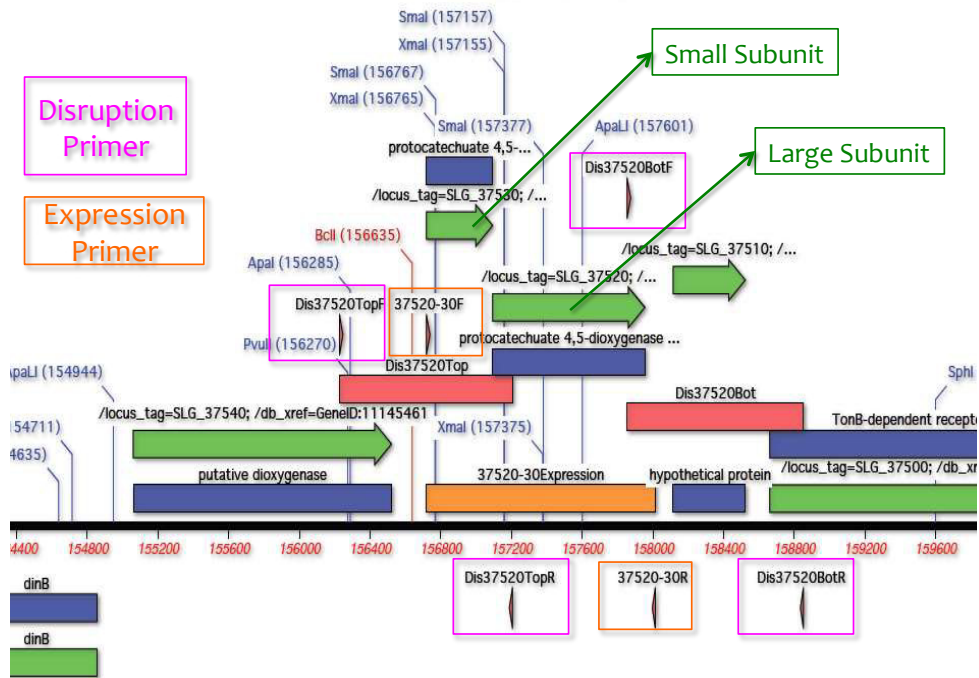


Figure 7.5 Genetic organization of *SLG_37530* (small subunit) and *SLG_37520* (large subunit). Primers used for the construction of expression and disruption of the gene(s) are boxed with orange and pink, respectively.

Table 7.2 PCR conditions for the 1.3 kb fragment.

	T (°C)	T (s)
Denaturation	98	10
Annealing	52,55,58,60	15
Elongation	68	90
End	4	∞
Cycles	35	

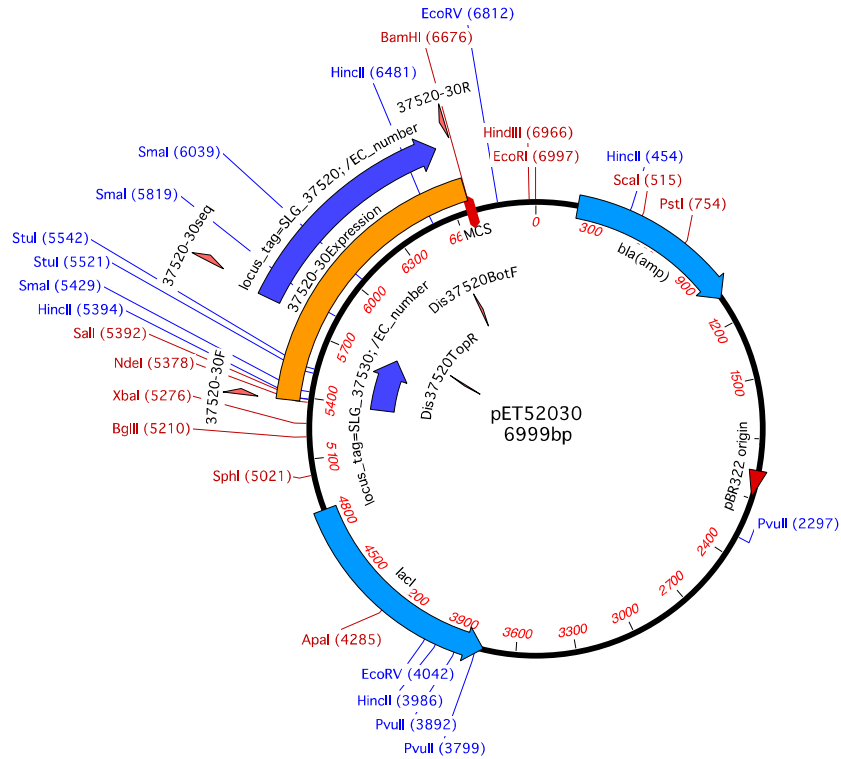


Figure 7.6 Restriction enzyme and gene map of the *SLG37520-30* expression plasmid, pET52030.

Expression of SLG_37520 and His tag-fused SLG_37530 in E. coli

E. coli cells harboring pET52030 were grown in 10 mL of LB medium (Bacto Tryptone, 10 g L⁻¹; yeast extract, 5 g L⁻¹; NaCl, 5 g L⁻¹) containing 100 mg of ampicillin L⁻¹ at 30°C. When OD₆₀₀ of the culture reached 0.5, expression of *SLG37520-30* with an N-terminal His tag was induced by adding 0.5, 1.0, and 2.0 mM of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside and incubated for 2, 4, 6, 25 h at 30°C or 16°C (Table 7.3). After the incubation, cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and broken by an ultrasonic disintegrator (UD-201; Tomy Seiko, Tokyo, Japan). The supernatant was obtained by centrifugation (19,000 x g, 20 min), and protein concentrations were determined by the method of Bradford, using a Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad, Richmond, Calif.). The production of *SLG_37520* and His tag-fused *SLG_37530* were examined by sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Broad-range molecular mass standards (Rainbow marker, GE healthcare, Buckingham, United Kingdom) were used. Gels were stained with Coomassie blue.

Table 7.3 Conditions tested for the gene expression using pET52030.

E. coli strain	Temp. °C	IPTG (mM)	Incubation time (hrs)	OD₆₀₀
E. Coli BL21 (DE3)	30	1	2	0.5
	30	1	4	0.5
	30	1	6	0.5
	30	0.5	4	0.5
	30	1	4	0.5
	30	2	4	0.5
	30	1	4	0 (at start)
	30	1	4	0 (at start)
	30	1	4	0 (at start)
	JM109 (DE3)	16	1	25
30		1	4	0.5
SoluBL21(DE3)	30	1	4	0.5
Bl21 Star(DE3)	30	1	4	0.5

Substrate quantification and enzymatic reaction

The amount of PCA, GA, VA, caffeic acid, 3MGA and catechol was analyzed by a high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (ACQUITY ultraperformance liquid chromatography system; Waters, Milford, MA) with a TSKgel ODS-140HTP, 2.3 μm C-18 column (Tosoh, Tokyo, Japan). The mobile phase was a mixture of 0.1% v/v formic acid in water (90%) and 0.1% formic acid v/v in acetonitrile (10%). The column temperature was maintained at 30°C, and the flow rate was 0.3 mL min⁻¹. Compounds were detected by UV-VIS detector (DAD). Enzymatic reaction was performed at 30°C using 50 μM each substrate and 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ crude enzyme in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). Portions of the mixtures were removed at start, 5, 10, 30, and 60 min and the reaction was stopped by the mixing with 1/4 volume of HCl.

Enzyme purification

Enzyme purification was performed using HisTrap affinity columns (GE Healthcare) and following by wash and elution with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 or 500 mM NaCl and different concentrations of imidazole (10, 20, 50, 100, 200, 300 and 500 mM).

Activity assays

Specific activities toward PCA and GA were assayed by incubation of the substrates with crude

enzyme for 0.5-2.0 min. The consumption of the substrates were monitored by HPLC at 259.8 nm for PCA and 271.5 nm for GA with the same conditions described above. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the conversion of 1 μ mol of substrates per min at 30°C.

Construction of SLG_37520 disruption plasmid

The fragments containing upstream and downstream of *SLG_37520* were amplified with DNA polymerase PrimeSTAR GXL, SYK-6 genomic DNA, and primer pairs of Dis37520TopF and Dis37520TopR, and Dis37520BotR and Dis37520BotF, respectively. The resultant fragments were connected by overlapping PCR with Dis37520TopF and Dis37520BotR primers to generate an *SLG_37520* deleted fragment. The resulting fragment was introduced into a gene disruption vector, pAK405 to construct pAK520D (Figure 7.7). The primer sequences are shown below and PCR conditions are indicated in Table 7.4.

Dis37520TopF, GCGGGATCCAATACGCTGGGGCATATCG

Dis37520TopR, GGAGATATCGGAAGCCGTCGAAGAAGG

Dis37520BotR, TGGGAATTCTTTGCAGCCTGCGCAGC

Dis37520BotF, CCTTCTTCGACGGCTTCCGATATCTCCATGTTTCATGAAGTGAGCCGC

Table 7.4 PCR conditions for the amplification of *SLG_37520* disruption fragment.

	PCR Conditions	
	T (°C)	t (s)
Denaturation	98	10
Annealing	52,55,58,60	15
Elongation	68	60
End	4	∞
Cycles	35	

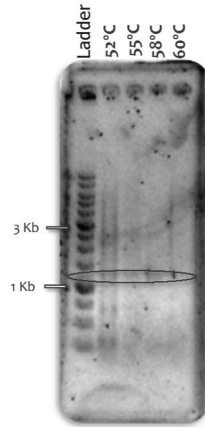


Figure 7.8 Agarose gel electrophoresis of the PCR products from SYK-6.

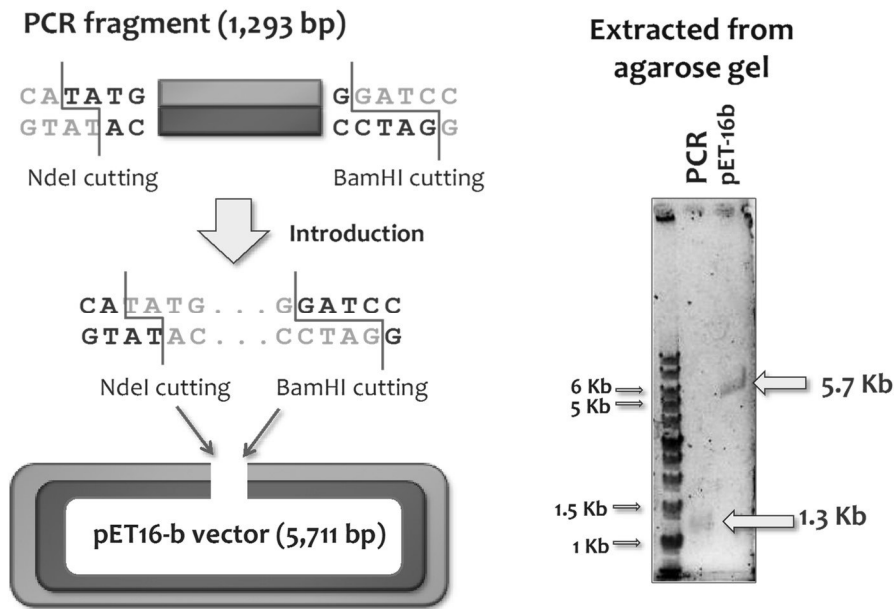


Figure 7.9 Left, schematic representation for the introduction of the amplified fragment into pET-16b. Right, agarose gel electrophoresis of the 1.3 Kb-fragment and pET-16b digested by NdeI and BamHI.

The ligated product was introduced into *E. coli* JM109. Thirteen colonies obtained by transformation of *E. coli* were incubated in LB medium, and plasmids were isolated from the cells. Resultant plasmids were digested by NdeI and BamHI, and plasmid no. 2, 7 and 10 gave the expected size of fragments (Figure 7.10). In order to evaluate whether PCR amplification was performed without any error in the sequence of amplified region, the clones 2, 7 and 10 were purified and sequenced. As a result, DNA sequences of three of them were completely correct. The sequenced region of clone 2 is shown below (Figure 7.11).

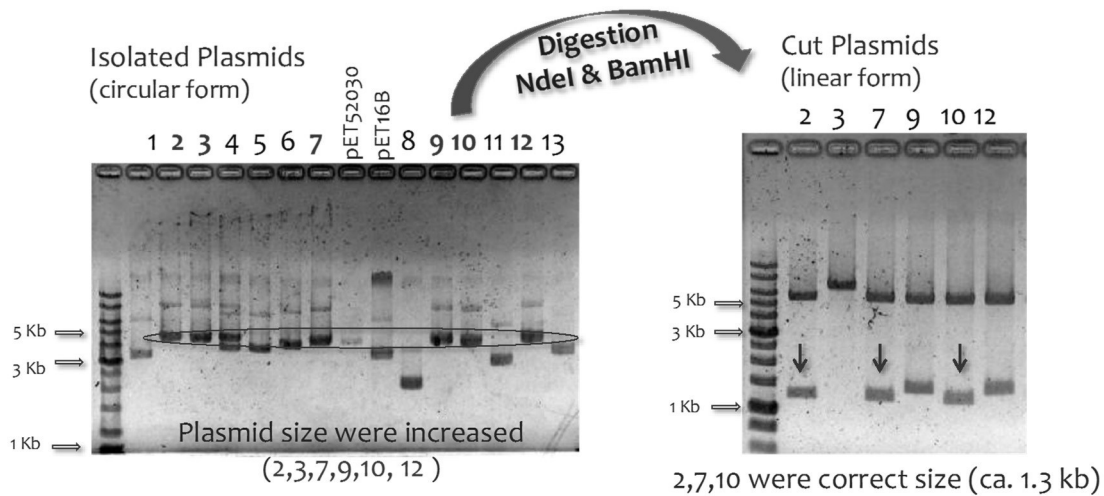


Figure 7.10 Agarose gel electrophoresis of the isolated plasmids (left) and their NdeI-BamHI digests (right).

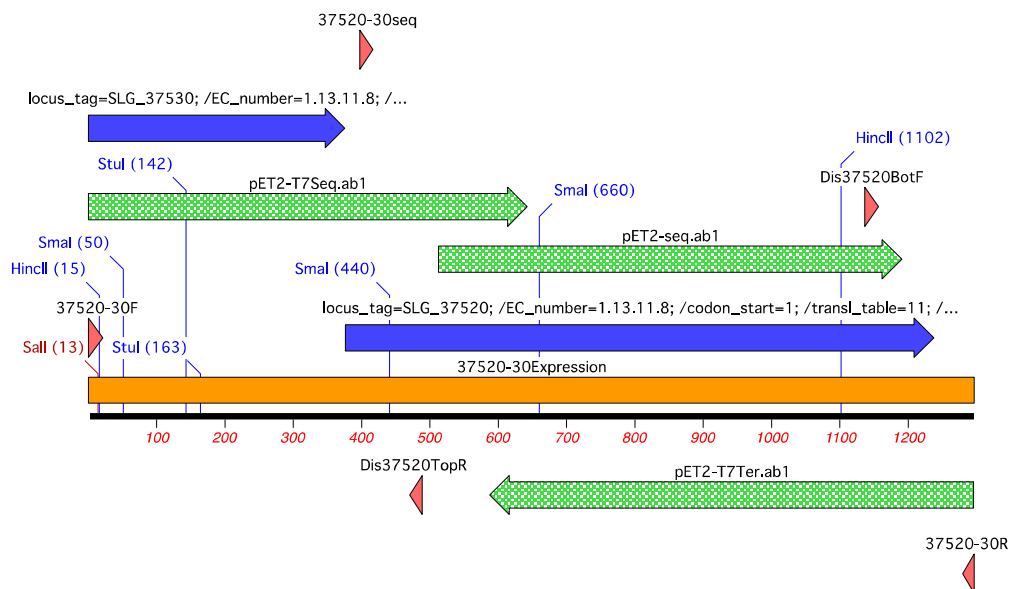


Figure 7.11 DNA sequencing of the candidate expression plasmid (clone 2). Blue and green arrows indicate the coding region of *SLG_37530* and *SLG_37520*, and sequenced region, respectively.

Production of SLG_37520 and His tag-fused (ht-) SLG_37530 in E. coli

The properties of the large and small subunits for the expression are shown in Table 7.5. In order to produce *SLG_37520* (large subunit) and ht-*SLG_37530* (small subunit) in *E. coli* BL21(DE3) as a host strain, several induction conditions were tested (Figure 7.12). However, the large subunit was not observed, and the small subunit was produced as an insoluble protein.

Table 7.5 Properties of SLG_37520 and ht-SLG_37530.

Subunit	No. of amino acids	Theoretical pI	Calculated molecular mass (Da)
SLG_37520	288	5.56	31070.4
ht-SLG_37530	145	6.62	15844.6

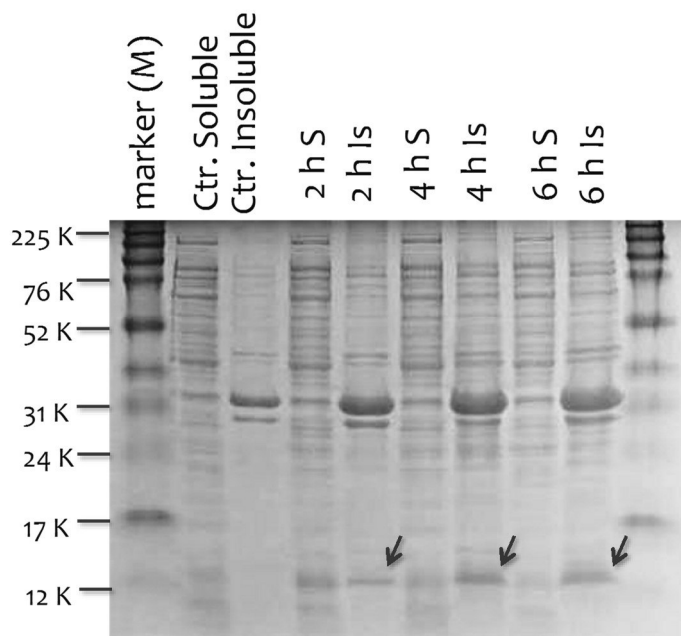


Figure 7.12 SDS-PAGE analysis of protein production in *E. coli* BL21(DE3). Lanes: 2, 4, and 6 h of induction by the addition of 1 mM IPTG. Cell extract of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-16b vector was used as a control (shown as Ctr.). Soluble and insoluble fractions are indicated by “S” and “Is”, respectively.

In order to improve the production of soluble SLG_37520 and ht-SLG_37530, six more conditions, three different concentrations of IPTG with or without pregrowth on LB (until $OD_{600}=0.5$) were tested (Figure 7.13). In a soluble fraction of the cells induced by the addition of 2 mM IPTG and without pregrowth (lane 7), the production of the putative large subunit (SLG_37520) was observed, however, the small subunit was not seen in all the conditions. The size of the product (ca. 40 kDa) was larger than the predicted molecular weight (ca. 31 kDa) calculated from the amino acid sequence, but this band was not found in the vector control.

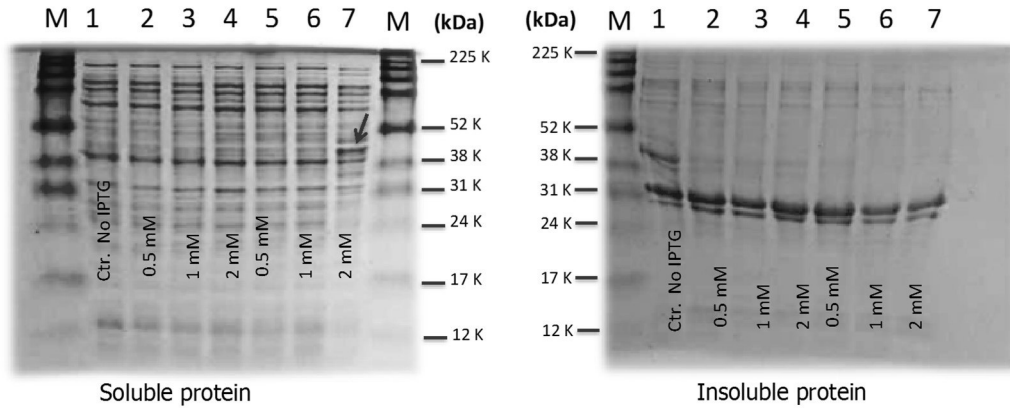


Figure 7.13 SDS-PAGE analysis of protein production in *E. coli* BL21(DE3). Lanes: 1, control (pET-16b); 2, 3 and 4, transformant cells with pregrowth before the addition of IPTG; 5, 6, and 7, transformant cells without pregrowth before the addition of IPTG. M, protein size marker with sizes in kDa.

The production of protein was examined in three different *E. coli* strains, JM109(DE3), SoluBL21(DE3), and BL21 Star(DE3). Protein expression was induced by the addition of 1 mM IPTG when the cell density reached $OD_{600}=0.5$, and further incubated for 4 h at 30°C. JM109(DE3) seemed to be a good host for enzyme production because this strain produced both SLG_37520 and His tag-fused SLG_37530 (Figure 7.14). However the majority of the protein was observed in the insoluble fraction. Therefore *E. coli* transformants were incubated at a lower temperature. After the addition of IPTG, *E. coli* JM109(DE3) harboring pET52030 was incubated for 24 h at 16°C. As a result, the amount of the soluble small subunit was considerably increased (Figure 7.15).

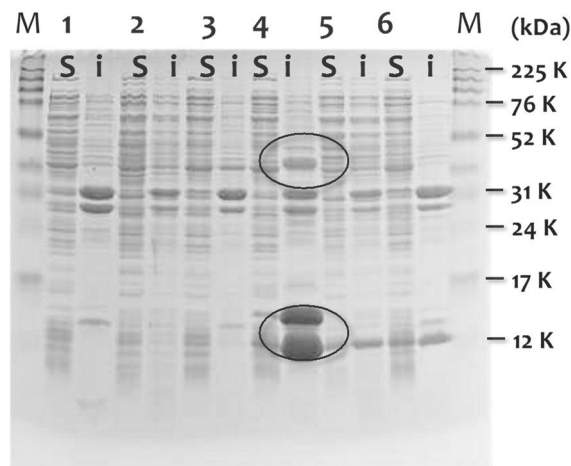


Figure 7.14 SDS-PAGE analysis of protein fractions. Lanes: M, 1, molecular mass markers; JM109(DE3) with pET-16b; 2, SoluBL21(DE3) with pET-16b; 3, BL21 Star(DE3) with pET-16b; 4, JM109(DE3) with pET52030; 5, SoluBL21(DE3) with pET52030; and 6, BL21 Star(DE3) with pET52030. Soluble and insoluble fractions are indicated by “s” and “i” at the top of each lane, respectively.

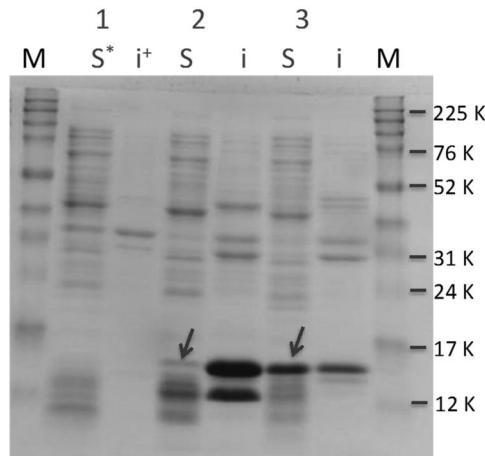


Figure 7.15 SDS-PAGE analysis of protein fractions. Lanes: M, molecular size markers; 1, JM109(DE3) with pET-16b; 2, JM109(DE3) with pET52030 induced for 4 h at 30°C; 3, JM109(DE3) with pET52030 induced for 24 h at 16°C. Soluble and insoluble fractions are indicated by “s” and “i” at the top of each lane, respectively.

Purification of the enzyme

SLG_37520 and ht-SLG_37530 were assumed to interact with each other to form heterotetramer as LigAB. Therefore, purification of the multimeric enzyme was performed using His Trap affinity columns following by the elution with different concentrations of imidazole (10, 20, 50, 100, 200, 300 and 500 mM) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH of 7.5) containing 500 mM NaCl (Figure 7.16). To reduce ionic strength and enhance the interaction of each subunit, a low salt concentration buffer was also used. However, only the small subunit, ht-SLG_37530 was purified by this method.

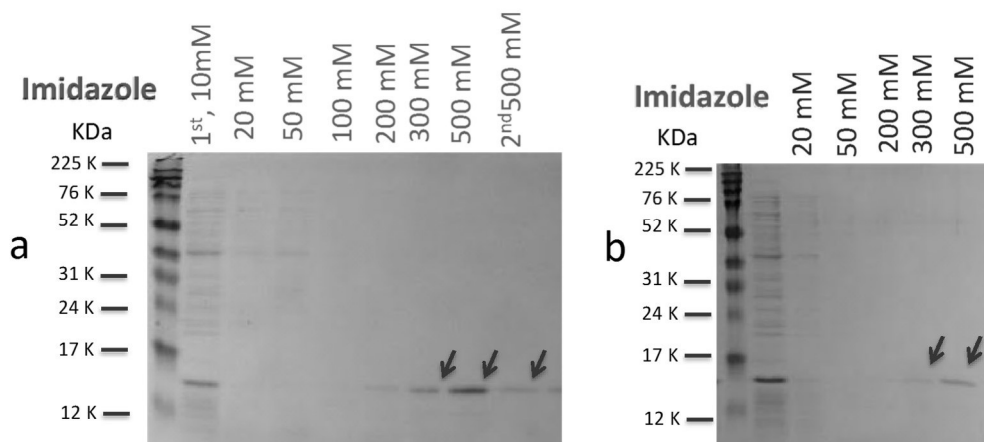


Figure 7.16 SDS-PAGE analysis of protein fractions after enzyme purification by His Spintrap. a, fractions eluted with different concentrations of imidazole in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 500 mM NaCl; b, fractions eluted with different concentrations of imidazole in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 mM NaCl.

Enzymatic reaction with catecholic substrates

The amount of PCA, GA, catechol, 3MGA, and caffeic acid was measured by HPLC system. Compounds were quantified by a DAD detector; In Figure 7.17, typical Reversed-phase chromatograms for PCA, caffeic acid, GA and 3MG with their corresponding UV spectra are shown. Retention times, determination λ , detection limits, linear regressions and correlation factors were shown in Table 7.6.

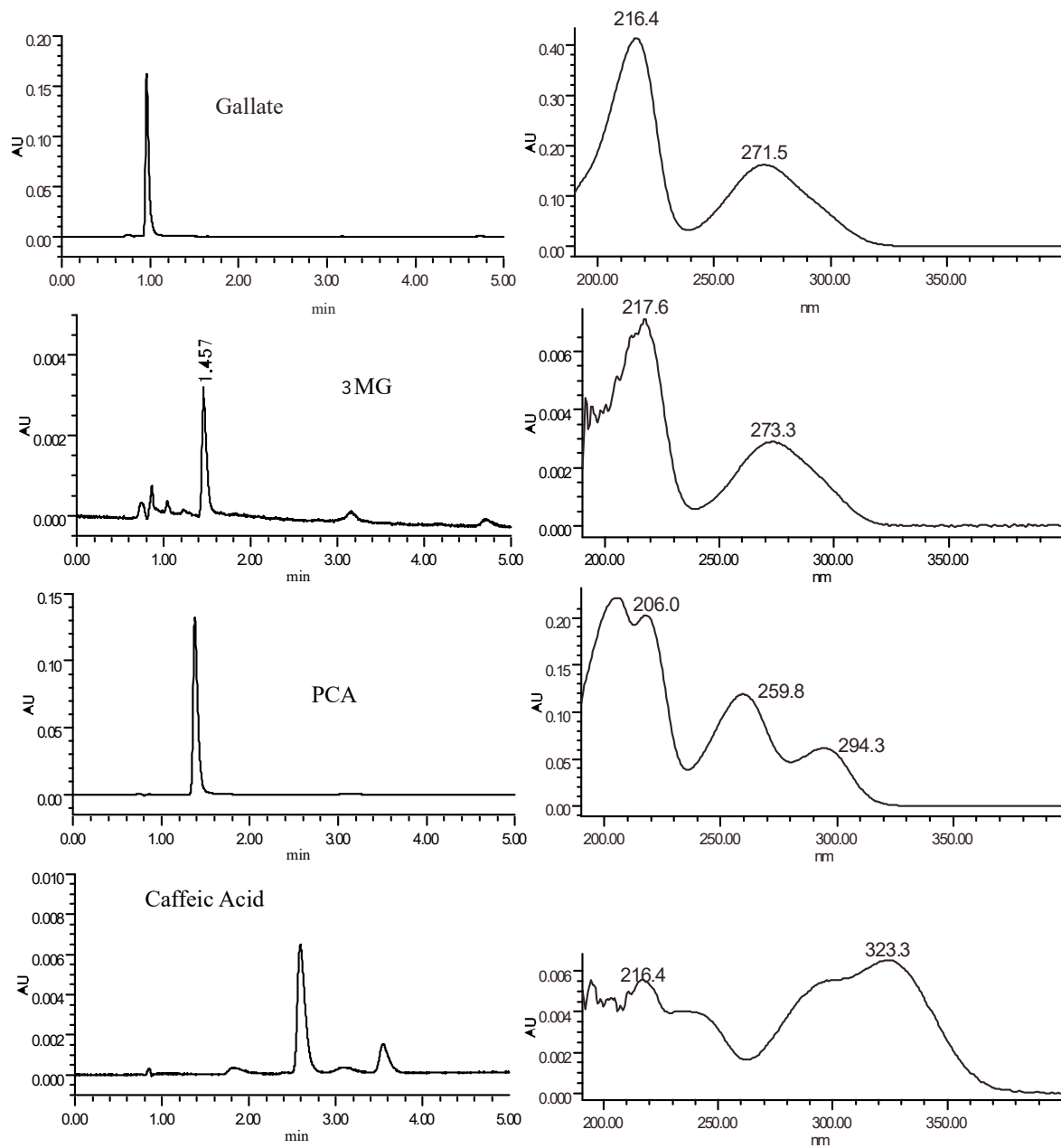


Figure 7.17 Chromatograms of PCA, caffeic acid, GA, and 3MGA. The chromatographic conditions are given in materials and methods.

Table 7.6 Analytical parameters evaluated for the target compounds.

Analyte/ Parameter	GA	PCA	Catechol	3MGA	Caff. Acid
Retention Time	0.955	1.457	2.240	1.376	2.591
Determination λ (nm)	271.50	259.80	275.80	273.30	323.30
DL, $\mu\text{g L}^{-1a}$	0.62	0.56	1.64	3.29	2.00
Linear regression	A=10833c -3455	A=11933c -1196	A=3366.8c- 658	A=16317c -5235	A=28371c -9228
R ²	0.9997	1	1	0.9996	0.9997

A, peak area (in mAU); *c*, concentration (μM). *a*, detection limit based on signal-to-noise ratio of 6:1, referred to as the concentration of the solution injected on the column.

Enzymatic conversions of GA, PCA, catechol, 3MGA and caffeic acid were examined using a crude enzyme. SLG_37520-30 only showed conversion activity toward PCA and gallate (Figure 7.18).

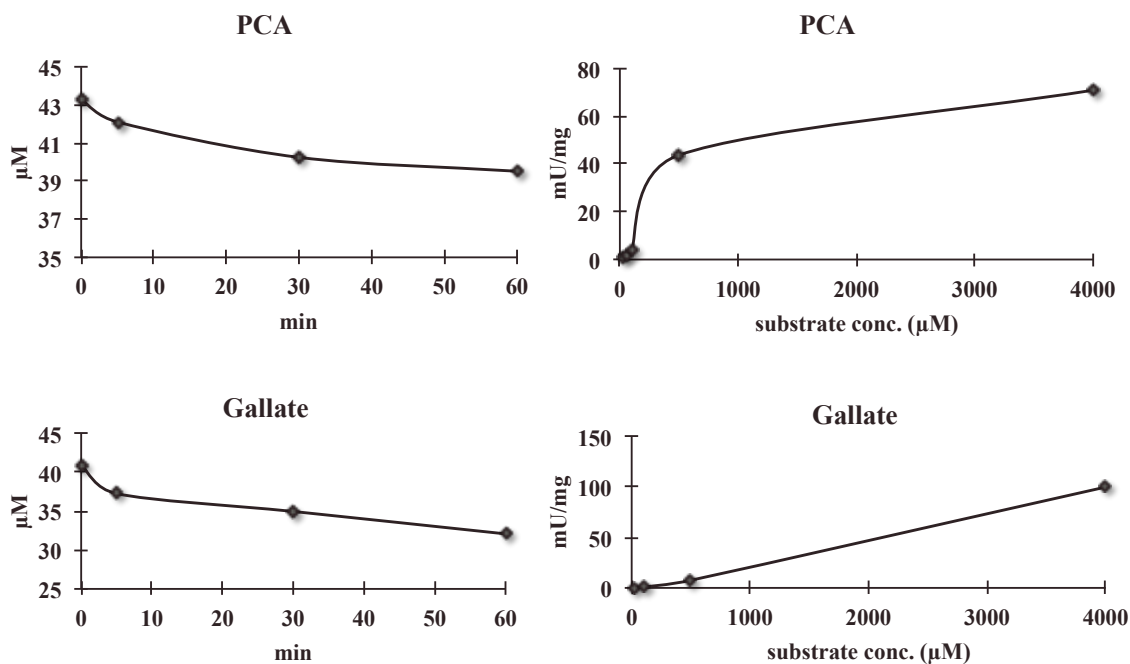


Figure 7.18 Left, conversion of GA and PCA. Right, specific activities of the crude enzyme. Activity assay conditions are given in materials and methods.

Disruption of the *ligB* homolog, *SLG_37520* in *SYK-6*

Construction of the gene disruption plasmid

To generate *SLG_37520* deletion fragment, overlapping PCR was performed to connect the two fragments, which contain upstream and downstream regions of the *SLG_37520* gene (Figure 7.19 and 5.20). The resulting fragment was digested by *EcoRI* and *BamHI*, and introduced into the same sites of a gene disruption vector, pAK405.

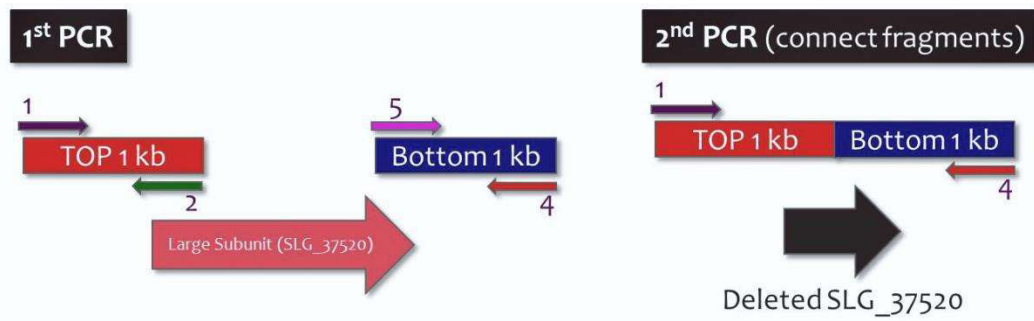


Figure 7.19 Schematic representation of overlapping PCR to generate an *SLG37520* deleted fragment. At first, top and bottom fragments were produced, and then overlapping PCR was performed using resultant fragments and primers, 1 and 4, to connect both fragments.

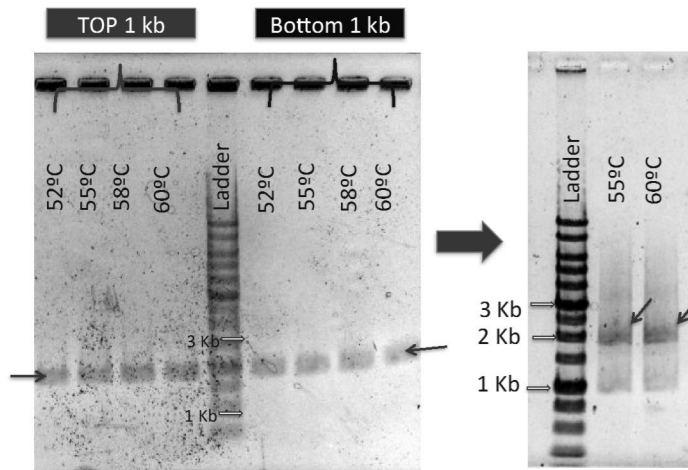


Figure 7.20 Agarose gel electrophoresis of the top and bottom fragments amplified by first PCR (left) and the fragment generated by overlapping PCR (right). Annealing temperatures for PCR are shown on the gel.

To confirm the introduction of the *SLG_37520* deleted fragment into pAK405, candidate plasmids were isolated and separated by agarose gel electrophoresis (Figure 7.21). A clone, no. 3

was suggested to contain the insert because this clone showed significantly slower migration than vector. This plasmid was digested with EcoRI and BamHI to separate the insert and the vector. Two fragments of 2.0 and 3.9 kb corresponding to the insert fragment and the vector, respectively, were observed. This plasmid was named as pAK520D (Figure 7.7), and used for the disruption of *SLG_37520* in SYK-6.

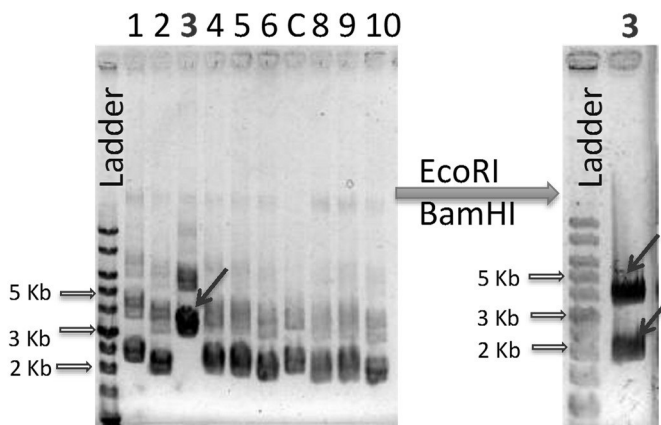


Figure 7.21 Agarose gel electrophoresis of candidates for the *SLG_37520* disruption plasmid. Isolated plasmids (right) and the plasmids digested with EcoRI and BamHI (left) were separated. Vector control (pAK405) is shown as “C”.

Introduction of pAK520D into Spingobium sp. strain SYK-6

pAK520D was introduced into SYK-6 by triparental mating technique, using *E. coli* HB101 harboring pAK520D as a donor, *E. coli* HB101 harboring pRK2013 as a helper, and SYK-6 as a recipient. When resultant mixture of these strains were plated onto LB containing antibiotics, nalidixic acid and kanamycin, only the gene modified SYK-6 which contains altered genome by the homologous recombination between pAK520D and the SYK-6 *SLG_37520* gene was expected to grow; because SYK-6 is resistant to nalidixic acid, pAK520D has a kanamycin resistance gene, and this plasmid cannot be replicated in SYK-6. As a result of triparental mating, a lot of candidates for single crossover strains were obtained (Figure 7.22).

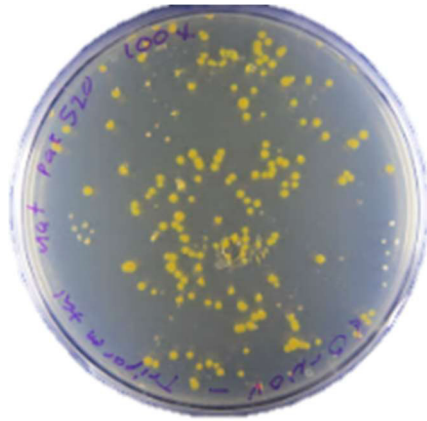


Figure 7.22 LB plate after the triparental mating. Candidates for single crossover strains were grown on a LB containing nalidixic acid ($12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and kanamycin ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Since a gene disruption vector, pAK405 contains a streptomycin-sensitive *rpsL* gene as a counter selection marker; double crossover strains (second homologous recombination) can be selected in the presence of streptomycin. To obtain the double crossover strain, individual single crossover colonies were grown on LB supplemented with $100 \mu\text{g streptomycin mL}^{-1}$. Occurrence of double crossover strain was examined by a PCR analysis using genomic DNA isolated from candidate clones (no. 1, 3, 6, 7, and 8) with a pair of primer 1 and 4. The amplified fragment from the double crossover strain should be a deleted fragment, while the fragments from the single crossover strain should be a deleted fragment and a wild-type fragment. Clones 1, 6, 7, and 8 showed two amplified fragments suggesting that these clones were mixture of single and double crossover strains. On the other hand, clone 3 appeared to be a double crossover strain (Figure 7.23).

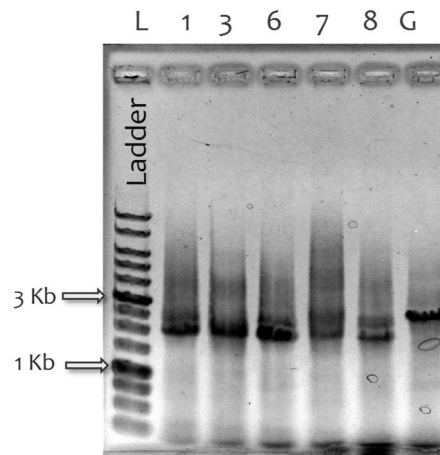


Figure 7.23 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products using genomic DNA of candidates for the double crossover strains. Two amplified fragments were observed from the clones 1, 6, 7 and 8. The clone 3 showed only a deleted fragment. G, Genomic DNA of SYK-6.

In order to confirm that the clone 3 is a double crossover strain, amplified fragments from the candidates were digested with HincII, which cut a position located in the deleted region of *SLG_37520*. The amplified fragment from the clone 3 was not digested by HincII (Figure 7.24), suggesting that this clone was a double crossover strain.

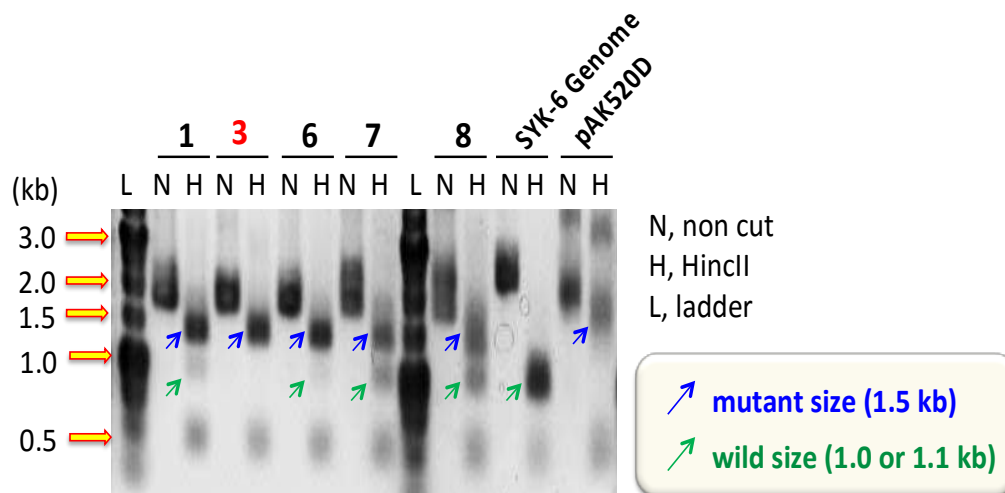


Figure 7.24 Agarose gel electrophoresis of PCR products digested by HincII. HincII digests from the double crossover strain should be 1.5- and 0.5-kb fragments while those from the single crossover strain should be 1.5-, 1.0- (or 1.1-), and 0.5-kb fragments.

In order to examine the role of *SLG_37520* in the catabolism of vanillate and syringate in SYK-6, the *SLG_37520* mutant was grown on both substrates (10 mM) separately. Growth of the *SLG_37520* mutant on syringate was significantly slower than that of SYK-6 (Figure 7.25). However, apparent growth difference was not observed on vanillate. On the other hand, crude enzyme of *SLG_37520-30* showed conversion activity toward not only gallate but also PCA, which are intermediates of syringate and vanillate, respectively. Although *SLG_37520* and *SLG_37530* were highly expressed during the catabolism of syringate and vanillate, these genes appeared to be involved in the syringate catabolism. Further characterization will be necessary to clarify the actual role of these genes in the catabolism of vanillate and syringate in SYK-6.

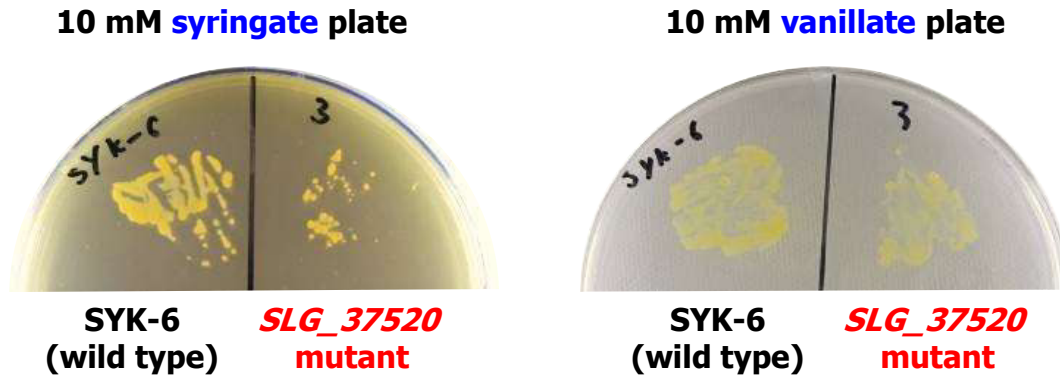


Figure 7.25 Growth of the *SLG_37520* mutant on syringate and vanillate.

VII.1.5 Conclusions

The product of *ligAB* homologues, *SLG_37530* (small subunit) and *SLG_37520* (large subunit), have the ability to convert PCA and gallate.

SLG_37520 was suggested to be involved in the catabolism of syringate in SYK-6.

VII.2 Analysis of DNA Binding by Myelin Transcription Factor 1 four Zinc Fingers

VII.2.1 Introduction

Gene regulation in eukaryotes is complex, diverse, and the subject of intensive research. Much of the DNA once labeled as “junk” or noncoding we now know is transcribed into RNAs that are involved in gene regulation and development. Genetic information in an organism is expressed in three classes: 1) structural (protein-coding) genes that are transcribed into messenger RNA (mRNA) and translated into polypeptides; 2) genes that code for ribosomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), or other classes of small RNAs, in which the transcription product is used directly; and 3) regulatory sites that are not transcribed but that serve as recognition sequences for proteins involved in DNA replication, transcription, and repair [227].

In prokaryotes and eukaryotes, not all genes are expressed at any given time. The expression of genes is regulated mainly at transcriptional initiation level. Regulation of gene expression in prokaryotes is tied to the availability of nutrients in the environment and clusters of genes called operons [228]. Operons code for proteins required for the same metabolic pathway that are concurrently expressed by positive and negative regulation. Eukaryotic multicellular organisms regulate their gene expression through five major levels: namely, modification of chromatin structures, the number of mRNA molecules synthesized, processing of the mRNA, and the rate of mRNA translation. Eukaryotic regulation of gene expression is thus much more complex than prokaryotic gene expression and involves a variety of factors and elements [228]. Protein-coding genes in eukaryotic organisms are transcribed from DNA into pre-messenger RNAs (pre-mRNAs) that then are processed into mRNA. Processing of mRNA involves splicing to remove introns; mRNA also is capped and methylated at the 5' end, and most mRNAs are polyadenylated at the 3' end [227].

5-Methylcytosine (5-mC) and methylated histones have been considered for a long time as stable epigenetic marks of chromatin involved in gene regulation. This concept has been recently revisited with the detection of large amounts of 5-hydroxymethylcytosine, now considered as the sixth DNA base, in mouse embryonic stem cells, Purkinje neurons and brain tissues [229]. 5-mC has been found to impact several essential biological pathways including among others regulation of gene expression, maintenance of chromatin structure, parental imprinting, X-chromosome

inactivation and control of cell development [230, 231].

Myelin transcription factor 1 (MyT1) is a zinc finger DNA-binding protein that is expressed in neural progenitors and oligodendrocyte lineage cells. Myt1 is a transcription factor that contains seven copies of a Zinc Fingers (ZnFs). The seven ZnFs are arranged in a 1, 2, 4 topology [232] (see Figure 1).

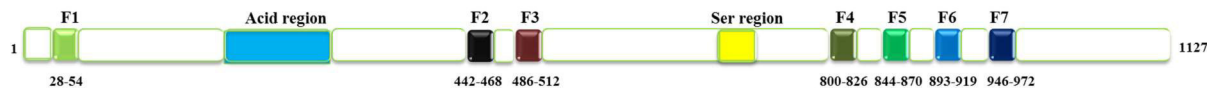


Figure 7.26 Schematic representation of mouse Myt1 gene.

The development and operation of the nervous system requires genetic regulation by a complex network of DNA-binding proteins, among which are members of the zinc finger family of transcription factors [233]. A small number of zinc finger transcription factors make up the MyT1 family and have been characterised in the development of the central nervous system. Proteolipid protein (PLP) has been proposed as one of the target genes of MyT1 family proteins.

The consensus sequence AAGTT is key of the cis-regulatory element of the β -retinoic acid receptor gene (-RARE) and is also found in the human PLP promoter [232]. It's interesting however why Myt1 carries three clusters of two ZnFs given that there are no tandem AAAGTT sites inside the proximal promoter of the mouse or human PLP1 gene. Romm, E., *et al.* [234] found that MyT1 can recruit Sin3B (a transcriptional regulator) and could indicate a mechanism in which the binding of MyT1 to distant sites and the alternation of Sin3B results in the reorganization of local chromatin structure; though, the binding mechanism and the *in vivo* targets of multiple two ZnFs clusters are currently uncharacterised.

Rationale

The research interest of the Guanajuato group is focused on the development of novel analytical procedures suitable for the determination of biological or chemical species in complex matrices. Specifically we have experience in the analysis of global DNA methylation as epigenetic mark triggered by environmental stress [235-241]. The project for my PhD dissertation focuses the characterization of DNA interactions with biological and chemical species, by means of development and application of analytical methodology. Consequently, this project is based on typical instrumental techniques as liquid chromatography and mass spectrometry; however

familiarization with complementary biological protocols is considered highly advantageous. It is now well established that metals/metalloids cause covalent modifications of DNA by a variety of molecular mechanisms underlying genetic regulation. If such interactions occur in a complex biological system, the results obtained by instrumental chemical analysis need to be complemented with a wide range of experimental methodologies in structural biology, biochemistry and cell biology in order to get a further insight on this topic.

The purpose of my visit is to undertake research/training in the School of Molecular Bioscience; this stay will enable me to acquire skills and training required for completing my PhD project in my home institution and to enhance my scientific development.

VII.2.2 Objective

General Objective

The objective of this research/training program is to understand the molecular details underpinning the regulation of gene expression in complex organisms. The work is focused on the characterization of protein-nucleic acid interactions and involves the use of a wide range of experimental methodologies in structural biology, biochemistry and cell biology. The information that we obtain will provide us with insight into the mechanisms by which gene expression is regulated and perhaps also information concerning the mechanisms underlying cancer onset and progression.

Specific Objective

Characterize the molecular details of DNA binding by the MyT1 transcription factor

VII.2.3 Materials and methods

Methodology

The realization of the project involves the following activities:

1. Recombinant DNA work involving the cloning of human transcription factors into bacterial or mammalian expression vectors using standard approaches.

2. Expression of cloned proteins and protein fragments in bacteria or cultured mammalian cells.
3. Purification of expressed proteins using affinity, size exclusion and ion exchange chromatography.
4. Measurement of protein-DNA interaction affinities using, microscale thermophoresis (MST) and 2D ¹H-¹⁵N heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) titrations.
5. Written report
5. Oral presentation at Discipline meeting (20 minutes, ~40 people present)

Table 7.7 List of the reagents and consumables used in this study

Reagent	Supplier
Acetonitrile (CAN)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Agarose	Quantum Scientific (Murarrie, QLD)
Ampicillin	Sigma (Castle Hill, NSW)
Amylose resin	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Bacteriological agar	Amyl Media (Kings Langley, NSW)
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Casein peptone	Amyl Media (Kings Langley, NSW)
Complete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail	Roche (Castle Hill, NSW)
Deuterium Oxide	Sigma (Castle Hill, NSW)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma (Castle Hill, NSW)
DNase I	Roche (Castle Hill, NSW)
dNTPs	Roche (Castle Hill, NSW)
DSS	Sigma (Castle Hill, NSW)
Ethidium bromide	Bio-Rad (Regents Park, NSW)
Glutathione Sepharose® 4B beads	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
HRV-3C protease	Produced in house
2-Iodoacetamide (IAA)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Quantum Scientific (Milton, QLD)
Lysozyme, from chicken egg white	Sigma (Castle Hill, NSW)
Mark12™ protein standards	Novex (Terry Hills, NSW)
NuPAGE® 4 × LDS sample buffer	Invitrogen (MT Waverley, VIC)
NuPAGE® MES buffer	Invitrogen (MT Waverley, VIC)
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma (Castle Hill, NSW)
QIAprep® spin miniprep kit	Qiagen (Doncaster, VIC)

QIAquick® gel extraction kit	Qiagen (Doncaster, VIC)
Restriction enzymes	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
SnakeSkin™ 10 kDa MWCO dialysis tubing	Pierce (Rockford, IL, USA)
sodium dodecylsulphate (SDS)	Sigma (Castle Hill, NSW)
T4 DNA ligase	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	Sigma (Castle Hill, NSW)
tris-{hydroxymethyl}aminomethane (Tris)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma (Castle Hill, NSW)
Trypsin	Promega (Alexandria, NSW)
Tween 20	Astral Scientific (Gyemea, NSW)
Vivaspin sample concentrators	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Yeast extract	Amyl Media (Kings Langley, NSW)
2log DNA ladder	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
¹⁵ NH ₄ Cl (>99%)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, USA)

Buffers and solutions

All buffers and solutions were prepared in MQW and were sterilised by autoclaving.

Lysis Buffer: 20mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) β-ME, 0.2mM PMSF, 1X of Complete™ EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 8.0

Binding assay buffer: 50 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0

Ion exchange buffer A: 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0; ion exchange buffer B: 50 mM Tris, 1M NaCl, 1 mM TCEP, pH 8.0

Dialysis Buffer: 50 mM TRIS, 30 mM NaCl, 1mM TCEP pH 8.0

SEC buffer (same for 1D NMR and ¹⁵N-HSQC): 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0

KCM: 100 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂

T4 DNA ligase buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP and 10 mM DTT

TAE buffer: 40 mM Tris, 40 mM glacial acetic acid, 2 mM EDTA

MES buffer: 50 mM MES, 50 mM Tris-Cl, 0.1% SDS, 0.8 mM EDTA

Blotting Buffer: 25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS, 20% MeOH, pH 8.3

Trace metals solution (per 100 mL): 0.6 g FeCl₂·7H₂O, 0.6 g CaCl₂·2H₂O, 0.12 g MnCl₂·4H₂O, 0.08 g CoCl₂·6H₂O, 0.07 g ZnSO₄·7H₂O, 0.03 g CuCl₂·2H₂O, 0.002 g H₃BO₃

Basic salt solution (per 1 l): 13 g KH₂PO₄, 10 g K₂HPO₄, 9 g Na₂PO₄, 2.5g K₂SO₄

DNA loading dye: 0.25% (w/v) bromophenol blue, 15% (w/v) Ficoll

Buffers for HEK293FT cells

293FT complete medium: 450 mL DMEM, 50 mL FBS, 5 mL 200 mM L-glutamine (100x), 5 mL of NEAA (100x), 5 mL sodium pyruvate (100x), 5 mL pen-strep (100x), 500 mg mL⁻¹ of geneticin (for maintaining but not for transfections)

Blotting Buffer: 25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS, 20% MeOH, pH 8.3.

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.

PBS-T: PBS with 0.1% (v/v) of Tween.

GIBCO® PBS buffer

Buffer C: 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂.6H₂O, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% (v/v)

Glycerol pH 7.4

Buffer D: 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂.6H₂O, 10 mM KCl, pH 7.4

Wash buffer: 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 0.5% (v/v) Igepal, pH 7.4

Plasmids

Ingrid Macindoe (Mackay/Matthews laboratory, University of Sydney) has previously cloned MyT1_{F4-7} (*Mus musculus*, synthetic gene) into pGEX6P (Ed Cram in Mackay/Matthews laboratory) expression vector. MyT1_{F4-7} was successfully subcloned into pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA, USA; bacterial, MBP tag) and pcDNA3.1 (mammalian, FLAG tag) expression vector and also was intended in pHISGB1 (bacterial, HIS-GB1 tag) without positive results. These plasmids contain an HRV-3C protease site immediately prior to the BamHI and EcoRI restriction sites and also code for ampicillin resistance.

Bacterial strains

Plasmid amplification:

DH5α: *Escherichia coli* (*E. coli*), *supE44*, *ΔlacU169* {Φ80*lacZΔM15*}, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Merlin Crossley, University of Sydney).

Protein overexpression

BL21(DE3)- F-*dcm ompT hsdS(rB-mB-)* with DE3, a λ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene (Integrated Sciences, Willoughby, NSW).

DH5α and BL21 strains were cultured in the presence of 100 μg mL⁻¹ Amp.

PCR

Each PCR reaction contained ~100 ng template (or a bacteria colony), 0.2 μ M reverse and forward primers, 1 U Pfu polymerase, 10% (v/v) DMSO and 0.4 mM dNTPs in Pfu buffer {20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄}. Thermocycler conditions are show in Table 7.8.

Table 7.8 PCR thermocycler conditions.

step	Temperature (°C)	Time (min)
1	94	10
2	94	1
3	54	1
4	72	2 (go to step 2, 30 times)
5	72	5
6	4	---

Restriction digestion

~100 ng of insert (MyT1_{F4-7}) and each vector {pMAL-LID, pHisGB1-Ldb1(14-200) and pcDNA3.1-FLAG-Ldb1(1-200)} were double digested with 1U EcoRI-HF and 1U BamHI in 20 μ L of 1X CutSmart™ buffer (37 °C, 2 h).

Agarose gel electrophoresis (AGE)

The products from PCR and digestions were analysed by AGE. 1% (w/v) agarose gels were made in TAE (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM glacial acetic acid, 2 mM EDTA) supplemented with 1 μ g mL⁻¹ of ethidium bromide. 6X DNA loading dye was added in a 1:5 ratio. The samples were run at 100 V in TAE. The desired bands were purified using a QIAquick® gel extraction kit.

Protein gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Proteins samples were run in NuPAGE® MES running buffer (210 V, 40 min) in NovexMini cell gel boxes (from Invitrogen). Samples were prepared in 4X LDS sample buffer with 1 % (v/v) β -mercaptoethanol and heated at 95 °C for 5 min. Molecular weight markers used were Mark12™ protein standards (Invitrogen) or MagicMark™ XP standard (for westerns blots applications). Gels were stained with Coomassie brilliant blue and detained with distilled water.

E. coli ligation, transformation and plasmid amplification.

Ligation

For each 10 µl of ligation mix (include a negative control for each vector), 1 µl vector with compatible digested ends (~100ng of pMAL, pDNA3.1 or pHISGB1) was mixed with 3 µl of insert (~50 ng) along with 1 U QuickStick Ligase in QuickStick buffer and incubated at RT for at least 5 min.

Transformation

Competent cells (~50 µl) were thaw on ice for 5 min and mixed with 50 µl of KCM. 10 µl of ligation reaction or 150–500 ng of plasmid was mixed with the cells and incubated on ice for 20 min. Cells were then heat shocked (90 s, 42 °C) and allowed to recover on ice for 5 min. After the addition of 200 µl of LB broth, cells were grown (90 min, 37°C) and plated on LB-1.5% (w/v) agar plates with Amp.

Plasmid amplification

10 mL of LB broth with Amp (100 µg mL⁻¹) were inoculated with a single colony, following by 14 h incubation, DNA was purified (QIAprep® Spin miniprep kit) and eluted in 50 µl of elution buffer. Clones were confirmed by sequencing at the Australian Genome Research Facility Ltd (Appendix 3).

Protein overexpression

E. coli BL21(DE3) cells were transformed with the construct plasmids (pGEX-MyT1_{F4-7}, pMAL-MyT1_{F4-7}). A single colony was incubated in 100 mL LB-Amp media overnight at 37 °C with shaking at 180 rpm, before being used to inoculate LB-Amp and grown until an OD₆₀₀ of 0.6 was reached. (Three different temperatures were tested for over expression: 20, 25 and 37 °C; 20°C was chosen). Overexpression of fusion proteins was achieved by the addition of IPTG (0.4 mM) and ZnCl₂ (100 µM), incubated overnight at 20 °C with shaking at 144 rpm. Cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 4 °C, 20 min) snap frozen with liquid nitrogen and stored at -20 °C.

¹⁵N labelled Protein overexpression

¹⁵N labelled proteins were expressed according to Marley *et al.* [242]. Overexpression cultures were prepared same than unlabelled until an OD₆₀₀ of 0.6 was obtained. Then cells were pelleted by centrifugation (5000 rpm, 4 °C, 10 min) and washed in same volume of basic salt solution at RT. The cells were pelleted again then resuspended in minimal medium containing ¹⁵NH₄Cl as nitrogen source. They were then grown at 20 °C for 40 min to clear ¹⁴N metabolites before induction with IPTG and ZnCl₂ (1 mM and 100 μM respectively) for 16-18 h.

Extraction of the soluble fraction

Per each litre of grew LB media, the pellets were thaw on ice and resuspended in 30 mL of lysis buffer followed by sonication using big sonicator tip setting 30s (2 s on and 1s off, 45% amplitude) for 5 times. Cells were spun at 9,000 RPM for 40 mins at 4 °C; the soluble fraction was then separated from the pellet.

Protein concentration determination

Protein absorbance was determined at 280 nm using a NanoDrop® 1000 spectrophotometer (BioLab, Scoresby, VIC) and the concentration determined according to the Beer-Lambert Law, using extinction coefficients ($\epsilon=9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) calculated from the amino acid sequence using the web-based program ProtParam on the ExPASy proteomics server (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.isb-sib.ch/>).

Mammalian cells maintenance and transfection

Maintenance of HEK293FT cells

Once the cells were at ~100% confluence, the conditioned media was discarded, and the cells were washed with 10 mL of PBS once. After removing the GIBCO® PBS buffer, 2 mL of trypsin was added (cells were dislodged from the plate in ~2 min). After that, 10 mL of complete medium was added to stop the trypsin reaction. Cells were transfer into a falcon tube and centrifuged at 300g for 3 min. After resuspend the cell pellet in 10 mL of complete media, 0.66 mL of these cells were added to 10 mL of complete media in a 10 cm dish to make a 1:15 dilution and 0.5 mL of cells to another dish with 10 mL to make a 1:20 dilution. After the addition of 500 mg

mL⁻¹ of geneticin, cells were grown at 37 °C with 5% CO₂ in a water-jacketed incubator until they reach ~100% confluence to repeat the maintenance.

Transfection of HEK293FT cells

Transfections were performed in antibiotic free media when the cells were ~70% confluent, the mixture of PEI and DNA {20-50 µg of DNA with a DNA:PEI ratio (wt/wt) of 1:2.5 in 1 mL of DMEM, incubated 10 min at RT} was added to each 10 cm dish. Cells were grown at 37 °C with 5% CO₂ in a water-jacketed incubator with a media change 24 h after transfection. After 48 h, cells were washed with GIBCO® PBS buffer, dislodged with 2 mL of trypsin. 10 mL of complete medium was added to stop the trypsin reaction. Cells were transfer into a falcon tube and centrifuge at 300g for 3 min and pellets were washed three times with GIBCO® PBS buffer before flash frozen in liquid nitrogen then stored at -80 °C for later use.

Immunoprecipitation with Anti-FLAG® M2 Affinity Gel

Transfected HEK293FT cells were resuspended in 300 µl of buffer D containing protease inhibitors (Roche® Complete 1x, 1mM PMSF and 1mM DTT), incubated on ice for 30 min, vortex for 10 s and spun at 3000g for 5 min in swinging bucket centrifuge. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 200 µl of buffer C containing protease inhibitors. After incubated on ice for 30 min, 360 µl of buffer C without NaCl were added to dilute NaCl to 150 mM. Afterward, cells were sonicated at 0.5 s on/off duty cycle at 50% power (30 s x 2 cycles). Chromatin was precipitated after 60 min of incubation on ice, followed by a centrifugation (16,000g, 20 min, 4 °C) to clarify lysate. Supernatant was removed to a fresh tube to use for immunoprecipitation.

20 µl of anti-FLAG® M2 Affinity gel were washed with MQW and equilibrated with PBS buffer and mixed with the protein extract followed for rotation at 4 °C overnight. Beads were spun (2000g, 5 min) and washed with 1 mL of wash buffer five times. 20 µl of 3X FLAG peptide (150 µg mL⁻¹ diluted in PBS) were added and rotated 30 min at 4 °C. Beads were spun and the supernatant among the different fractions (insoluble, soluble, nuclear, cytoplasmic, flowthrough, first and fourth washes and beads) were run on SDS-PAGE before western blot. All buffers, protein samples and beads were kept on ice in order to minimise protein degradation.

Western blotting

The protein fractions (soluble, nuclear, cytoplasmic, flowthrough, first and fourth washes, elutions and beads) were separated by SDS-PAGE and transferred to Hybond™ ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Castle Hill, NSW) using a Small Transfer system in blotting buffer. Transfer took place at 400 mA for 1 h at RT. After transfer, the membrane was blocked in 5% skim milk in PBS-T buffer for 2 h with rocking at RT. After washing in PBS-T, the membrane was incubated with a conjugate primary {HRP} antibody with anti-FLAG and anti-HA antibodies (1h at RT or O/N at 4 °C) dissolved in skim milk (1:1000). The membrane was then washed in PBS-T (5 × 15 min). Antibody detection was carried out using the chemiluminescent detection by adding 1:1 mixture of enhanced luminal reagent and oxidizing reagent (Western Lightning™ chemiluminescence reagent Plus PerkinElmer, Rowville, VIC) to the membrane for 1 min followed by the removal of excess reagent, the membrane was developed on Kodak® film.

Purification

Annealing and purification of DNA oligonucleotides

Synthetic DNA oligonucleotides were purchased (Integrated DNA Technologies Inc. Iowa, USA) for the DNA binding assays (Hes1Fwd, 5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'; Hes1Rev, 5'-GTGAAACTTCCCAAACCTTCTT-3'; Stt3bFwd, 5'-GACAAAGTTTGGTCCAAGTTGGCT-3'; Stt3bRev, 5'-AGCCAACCTTGGACCAAACCTTGTGTC-3'; Fl-Hes1Fwd, Fl-5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'; FlStt3bFwd, Fl-5'-GACAAAGTTTGGTCCAAGTTGGCT-3'; Appendix 1). For annealing, equal amounts of complementary oligonucleotides were mixed, heated 10 min at 92 °C, and slowly cooled to 25 °C. Annealed oligonucleotides were purified by SEC (HiLoad Superdex™ 75 pg column, GE Healthcare Life Sciences) in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 and concentrated using Vivaspin™ (3 kDa MWCO) centrifugal concentrators.

Affinity purification

Soluble fractions containing the fusion proteins were applied to the beads (in a 100 mL econo-column), washed with MQW and pre-equilibrated with lysis buffer (glutathione-Sepharose® Beads for GST-MyT1_{F4-7} and amylose beads for MBP-MyT1_{F4-7} fusion protein). After binding the

protein to the beads at 4 °C with rotation for 90 min, the beads were washed with lysis buffer and incubated with 50 µl of HRV 3C Protease at 4 °C overnight. Fusion proteins were then eluted from the column with lysis buffer in fractions of 1×bead volume. Samples were collected throughout all the purification process and analysed by SDS-PAGE. All buffers, protein samples and beads were kept on ice in order to minimise protein degradation.

Cation exchange chromatography.

MyT1_{F4-7} was further purified by cation exchange chromatography. Prior to use, buffers and samples were filtered with 0.22-µm filters. Cleaved product was dialysate in low salt buffer before loading onto a UNO-S1 column (BioRad, Hercules, CA, USA) using a Biologic DuoFlow HPLC system (BioRad, Hercules, CA, USA). A linear gradient of .03–0.5 M NaCl over 37 mL, followed by a linear gradient of 0.5–1 M NaCl over 5 mL (separation was achieved in 50 mM TRIS, 1 mM TCEP at pH 8) The flow rate was 1 mL min⁻¹.

Size exclusion chromatography

MyT1_{F4-7} was additionally purified by size exclusion and cation exchange chromatography. Prior to use, buffers and samples were filtered with 0.22 µm filters. The cleaved fusion proteins were loaded onto a HiLoad Superdex™ 75 pg column (GE Healthcare Life Sciences) using a Biologic DuoFlow HPLC system (BioRad, Hercules, CA, USA). The column was run in SEC buffer, at a flow rate of 1 mLmin⁻¹

SEC-MALLS

SEC was combined with multi angle light scattering detector using an Akta FPLC (GE Healthcare, Castle Hill, NSW) coupled with a GE Superose™ 12 3.2 x 300 mm column (GE Healthcare Life Sciences) attached to a multiangle laser static light scattering. The sample was run at 0.05 mL min⁻¹ and RT (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0). Elution was also monitored at 260 and 280 nm. Data analysis was conducted with Astra software.

Microscale thermophoresis (MST) assays

MST assays were accomplished on a Monolith NT.115 instrument. Serial dilutions were done to give 16 samples. Fluorescence labelled DNA was added to each protein dilution to a final

concentration of 20 nM and samples were put in capillaries. Assays were run with LED power at 80% and MST power at 60% and the relative fluorescence for each point of the titration was plotted as a function of protein concentration.

In-gel mass spectrometry sample preparation

The band was excised from Coomassie gel and cut into 1 mm cubes using clean razor blade on a clean glass surface. After transferred to an eppendorf tube, pieces were equilibrated in 0.1M NH₄HCO₃ (500 µL, 20 min, 25 °C). Afterward, Coomassie was removed with 0.1M NH₄HCO₃/50% ACN and dehydrated with 500 µL ACN. Once dehydrated, protein was reduced with 200 µL 10 mM of DTT (60 min, 56 °C) following by alkylation with 55 mM of IAA (60 min, 25°C). After alkylation, gel was equilibrated with 0.1M NH₄HCO₃ (500 µL, 20 min, 25 °C) and dehydrated previous to digestion with trypsin (~200 ng, 50 mM TRIS, 16 h at 35 °C; pH 8). The digested solution was transfer into a new silanized tube following by three successive extractions with 0.1% TFA/60%ACN. Finally before MS analysis, sample was freeze-dried and cleaned up in a homemade C18 filter tip.

VII.2.4 Results and discussion

Expression, purification and confirmation of MyT1_{F4-7}

pMAL, pDNA3.1 and pHISGB1 were obtained by cutting construction plasmids containing this vectors by BamH1 and Ecor1 (Figure 7.27 A). The 582 bp fragment which carries MyT1_{F4-7} (MyT1_{F4-7} properties in Appendix 2) was obtained from pGEX-MyT1_{F4-7} by PCR amplification (Figure 7.27 B) and introduced successfully in pcDNA3.1 and pMAL vectors (DNA sequenced results are shown in Appendix 3).

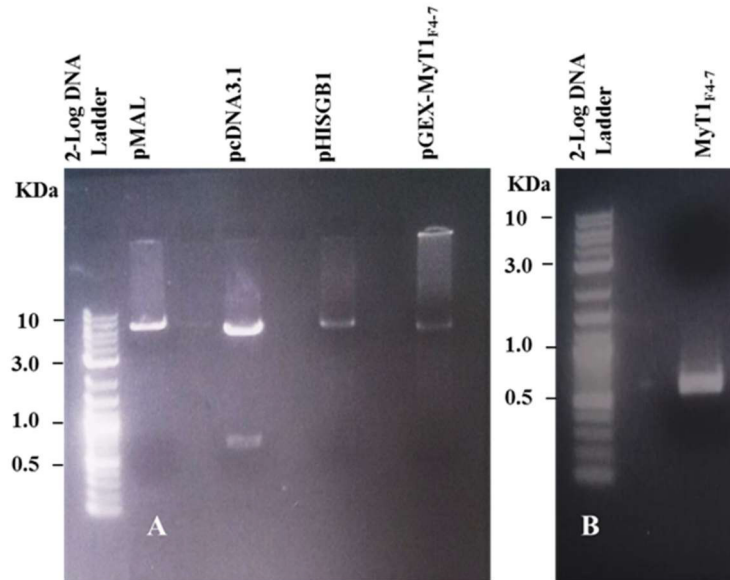


Figure 7.27. A, Agarose gel electrophoresis of the digested vectors and B, agarose gel electrophoresis of digested PCR product of MyT1_{F4-7}.

Expression in HEK293FT cells

Human embryonic kidney cell-line 293FT (HEK293FT) cells are commonly used to exogenously express target proteins to produce folded structures that are poorly produced in non-mammalian cells.

HEK-293FT cells were transfected with pcDNA3.1-MyT1_{F4-7} (FLAG tag) recombinant plasmid. Afterward anti-FLAG® M2 affinity gel purification followed by cleavage {20 µl of 3X FLAG peptide (150 µg mL⁻¹ diluted in PBS); 30 min at 4 °C}. Western blot and immunochemiluminescence assay were used to detect its expression. Expression was confirmed with the band appearing at ~25 kDa (Figure 7.28).

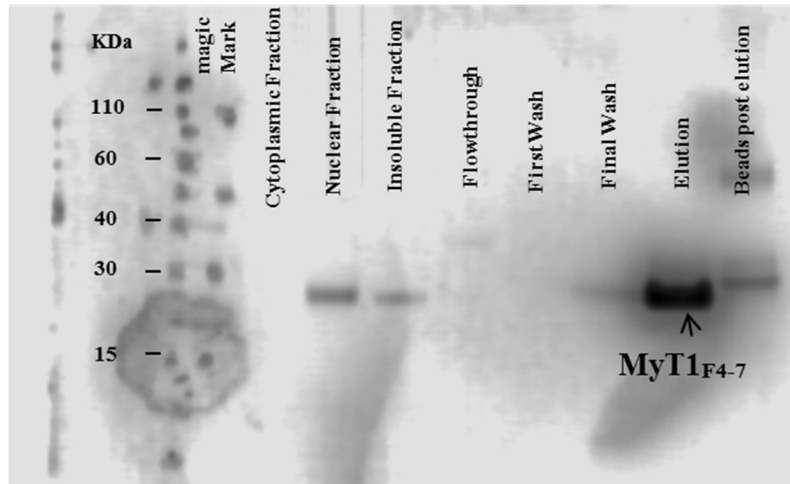


Figure 7.28 Western blot of pcDNA3.1- MyT1_{F4-7} construct expressed in HEK293FT cells.

Even though the expression seems to be good in HEK cells, bacterial systems are more suitable for produce bigger quantities of protein at lower cost. In order to obtain this four zinc finger protein in *E. coli* cells and in soluble form, some trials were carried out to express MBP-MyT1_{F4-7} (62.4 kDa) and GST-MyT1_{F4-7} (45.9 kDa) fusion proteins at 20, 25 and 37 °C. The expressed proteins were affinity purified on amylose and glutathione Sepharose™ resin respectively; both tags were cleaved with HRV 3C protease (Figure 7.29). Better expression was obtained at 20 °C. After cleavage of GST-MyT1_{F4-7}, the presence of MyT1_{F4-7} (19.9 kDa) is not evident, and moreover since the gap in molecular weight between of GST (26 kDa) and MyT1_{F4-7} is closer than MBP (42.5 kDa) and MyT1_{F4-7}, further expression was carried out using MBP-MyT1_{F4-7} fusion protein.

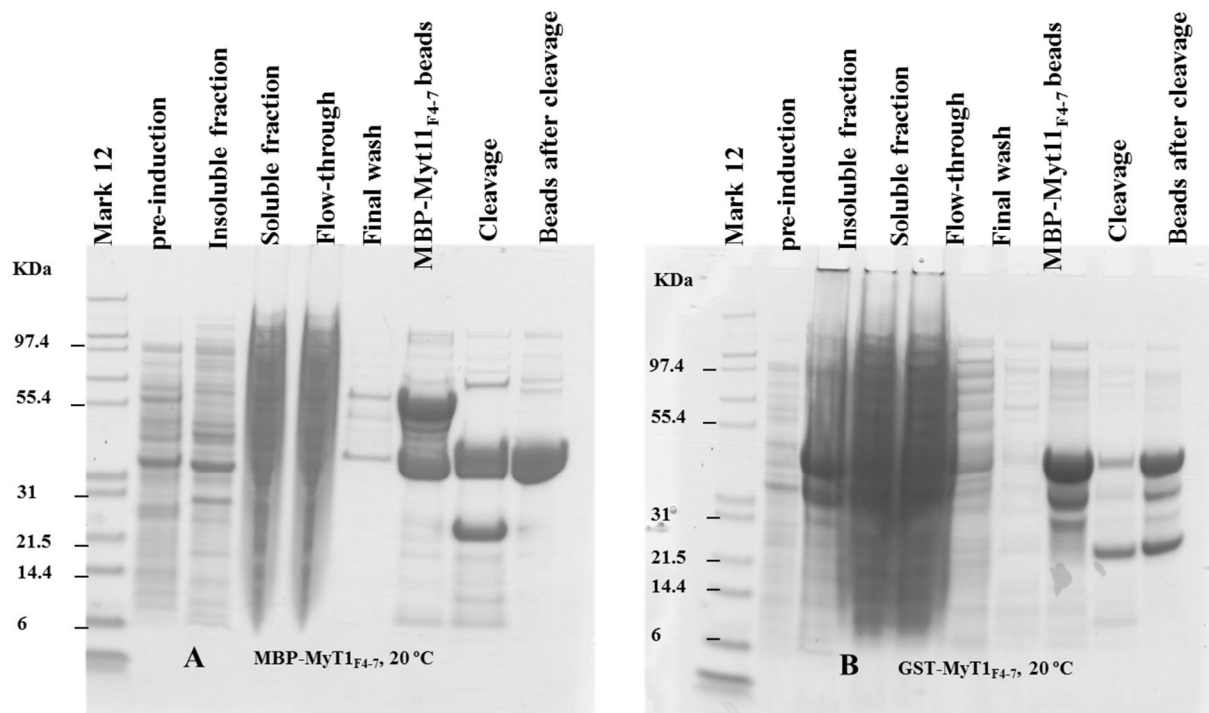


Figure 7.29 SDS-PAGE analysis of protein expression in *E. coli* BL21(DE3) A, MBP- MyT1_{F4-7} and B, GST- MyT1_{F4-7} both at 20 °C.

Confirmation of MyT1_{F4-7} by MS

The possible MyT1_{F4-7} band was cut from the SDS-PAGE. ESI-FTICR-MS analysis was accomplished after reduction with DTT, alkylation with IAA and digestion with trypsin. Ions scores > **34** indicate **identity** or **extensive homology** (p<0.05). For this band, MS analysis indicated a score of 1402 for MyT1_MOUSE (SwissProt database; Figure 7.30).

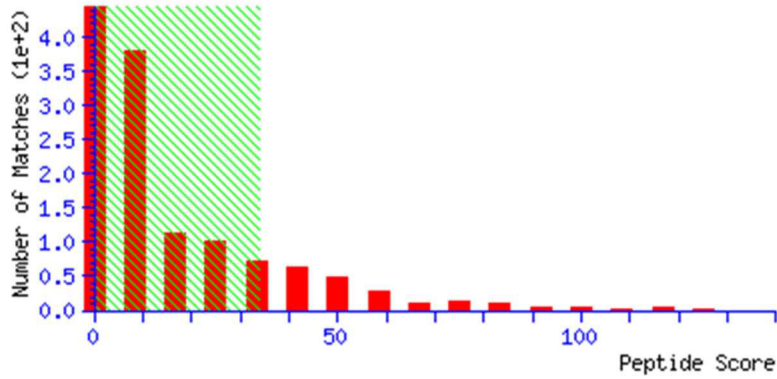


Figure 7.30. Peptide score distribution for trypsin digested MyT1_{F4-7}. Ion score is $-10\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

After cleavage with HRV 3C, MyT1_{F4-7} was further purified by size exclusion; however purification was incomplete, therefore further purification by cation exchange was performed (Figure 7.31).

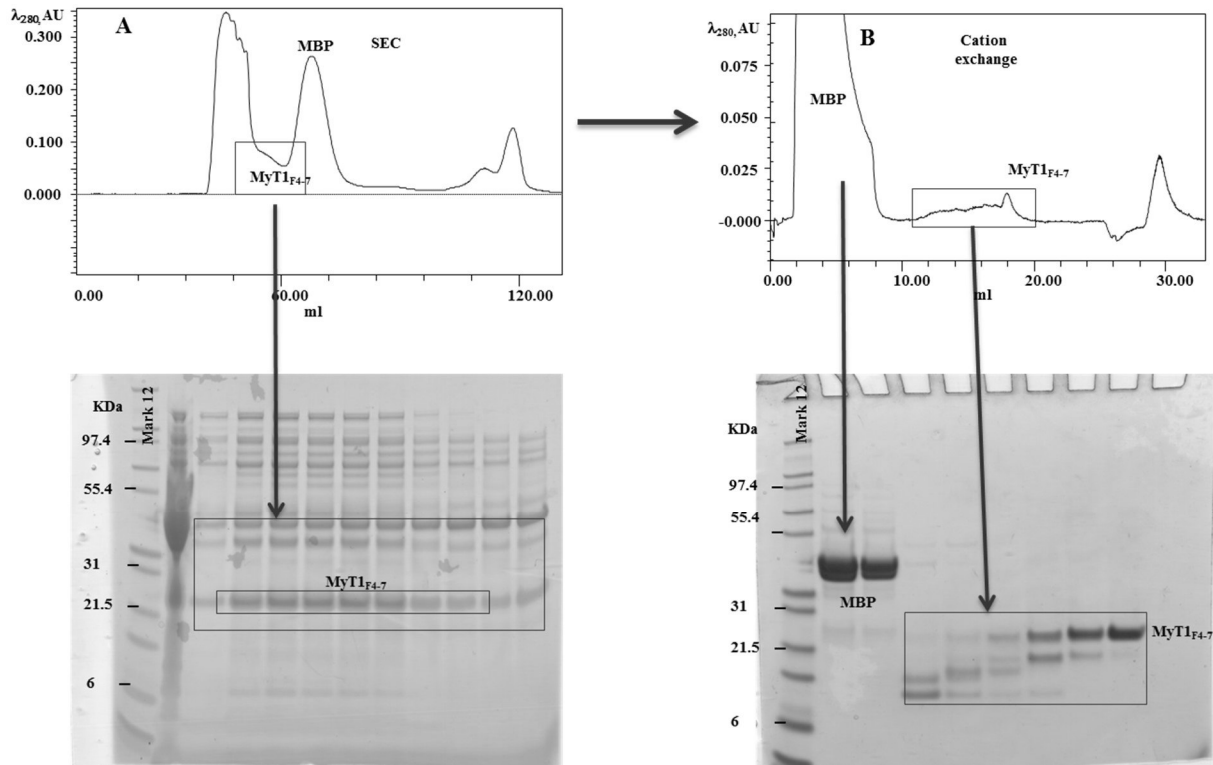


Figure 7.31 Purification of MyT1_{F4-7} by SEC followed by cation exchange.

Better results were obtained by switching the separation order (cation exchange followed by size exclusion, Figure 7.32).

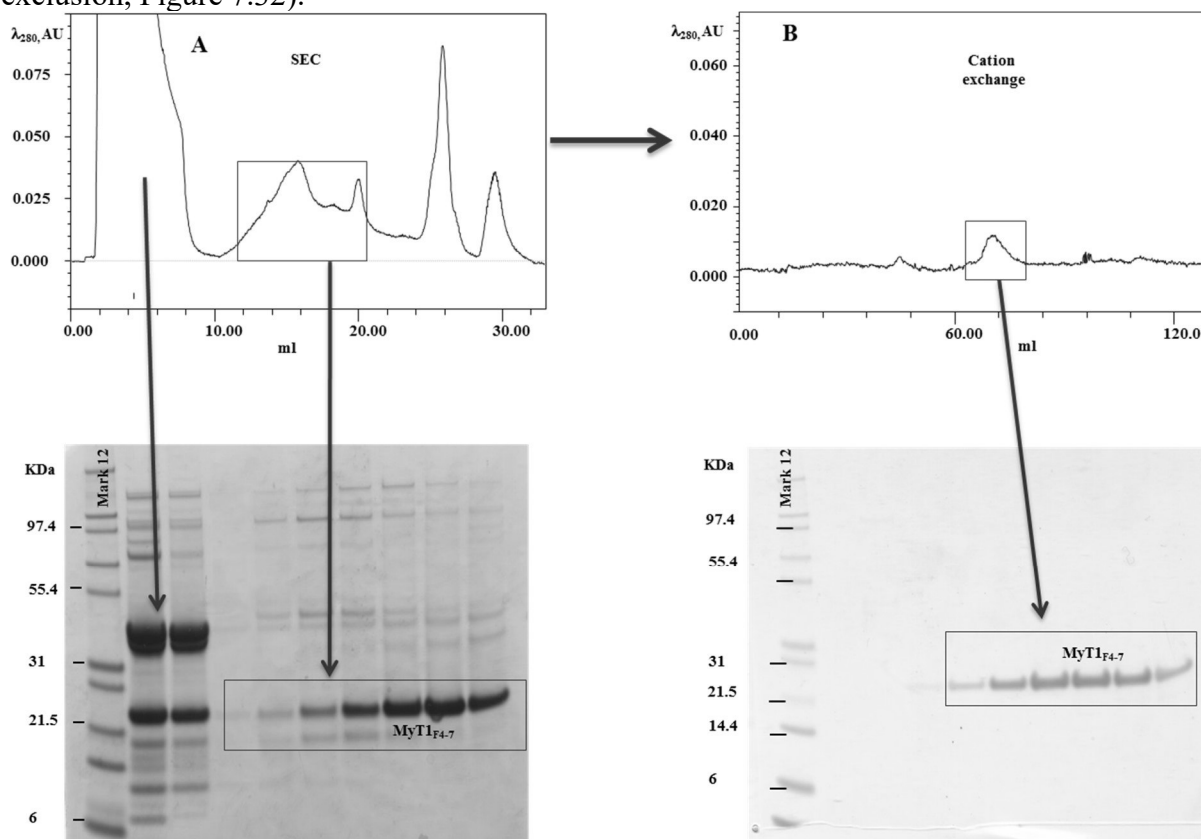


Figure 7.32 Purification of MyT1_{F4-7} by cation exchange followed by SEC.

Once purification conditions were established for MyT1_{F4-7}, same procedure was used for the expression and purification of MyT1_{F4-7} required for MALLS, ¹H NMR, ¹⁵N HSQC titrations and MST assays.

MyT1_{F4-7} 1D ¹H NMR spectrum

A ¹H NMR spectrum was recorded to confirm that MyT1_{F4-7} was folded. MyT1_{F4-7} seems to have a well-defined structure as the dispersed and narrow signals. Also, MyT1_{F4-7} seems to keep its structure even after being flash frozen and thawed (Figure 7.33). Spectra were referenced using the chemical shift of DSS set as 0.0 ppm, recorded at 600 MHz, 44 μM and 25 °C.

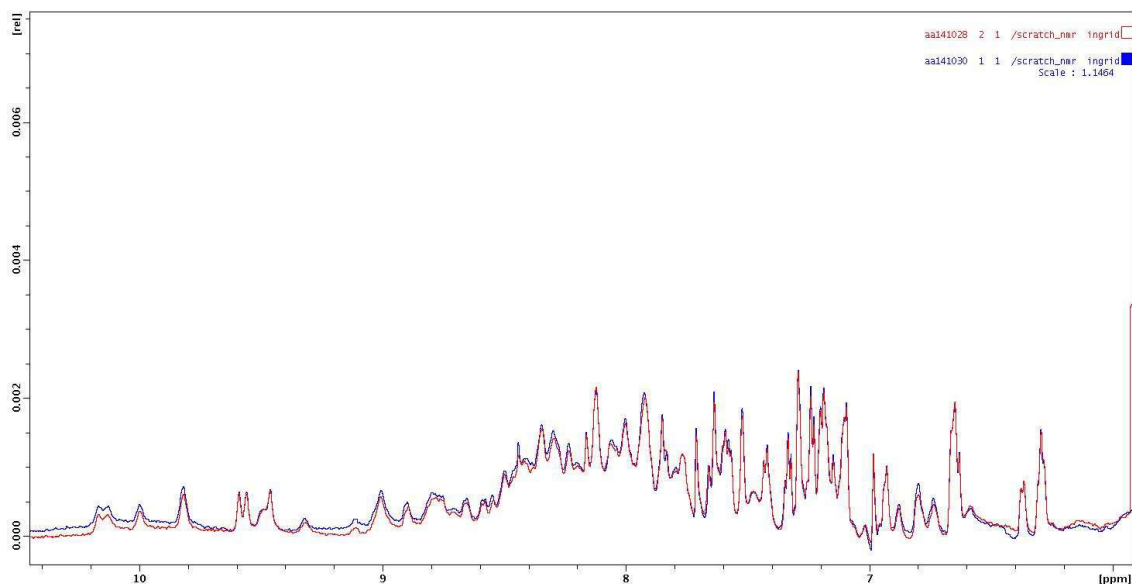


Figure 7.33 ^1H NMR spectrum of MyT1_{F4-7}. The spectrum was acquired at RT °C on a 800 MHz spectrometer, before (red line) and after flash-freezing and thawing (blue line).

SEC-MALLS

Purified MyT1_{F4-7} was subjected to SEC-MALLS to measure its MW and assess its possible oligomerization state. For this analysis the sample was injected through the SEC column coupled to three detection systems that measure changes in Light Scattering, UV and Refractive Index (Figure 7.34). The magnitude of the light scattering is directly proportional to the MW. MyT1_{F4-7} at a concentration of 44 μM was analysed and an average MW of 19.03 kDa ($\pm 1.7\%$) was calculated in the center of the peak (1.5-1.65 mL), which was in relatively good agreement with the predicted value 19.9 kDa based on the amino acid sequence (Appendix 2; ProtParam tool in ExPASy).

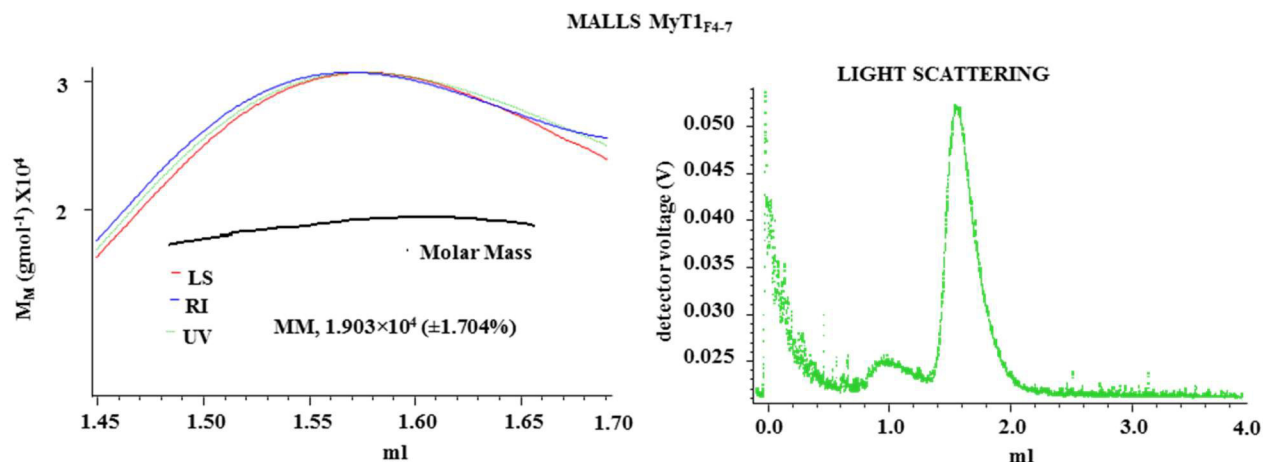


Figure 7.34 SEC-MALLS analysis of MyT1_{F4-7}

MyT1_{F4-7} ¹⁵N-*HSQC*

Several studies have shown that retinoic acid receptor (RARE) motif (AAGTT) could bind two MyT1-type ZnFs [243]. In order to analyze the possibility that DNA with two RARE motifs like Hes1 (ds 5'-AAGAAAAGTTTGGGAAAGTTTCAC-3'; the site for a double finger to bind to is underlined) could bind the four ZnFs of MyT1_{F4-7}, a ¹⁵N-*HSQC* and MST assays were performed.

Four liters of minimal media containing ¹⁵NH₄Cl as nitrogen source were cultivated and purified (Figure 7.35). For ¹⁵N-*HSQC* titration, Hes1 was annealing with equal amounts of its complementary oligonucleotide and purified from the annealing mixture by SEC (Figure 7.36). After concentrated using Vivaspin™ (3 kDa MWCO) centrifugal concentrators, ¹⁵N- MyT1_{F4-7} was ~120 μM and Hes1 ~1230 μM.

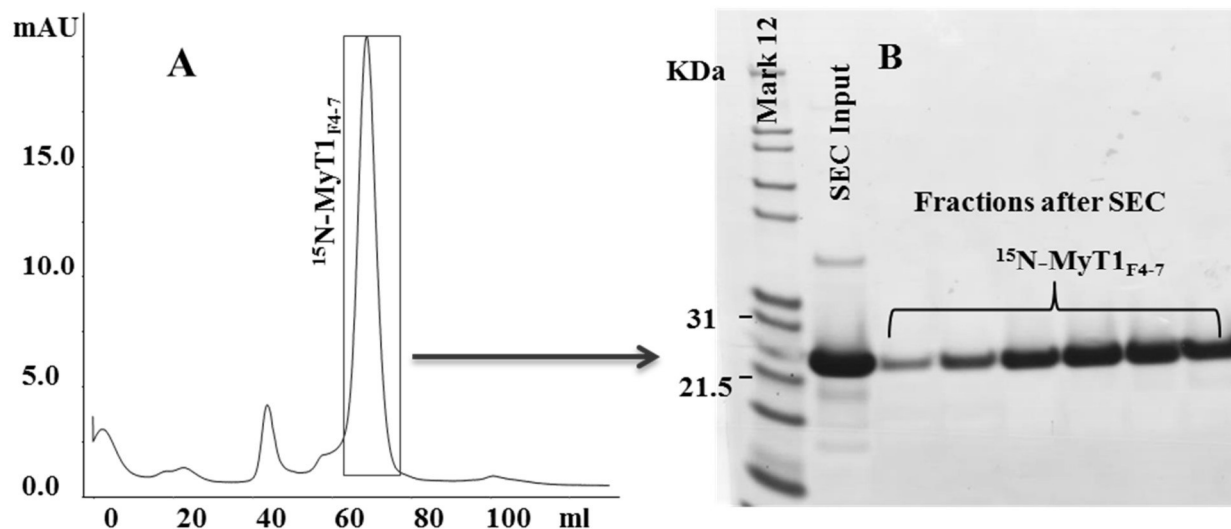


Figure 7.35 Purification of ^{15}N -MyT1_{F4-7} by cation exchange followed by SEC. Fractions under box area were pooled for HSQC.

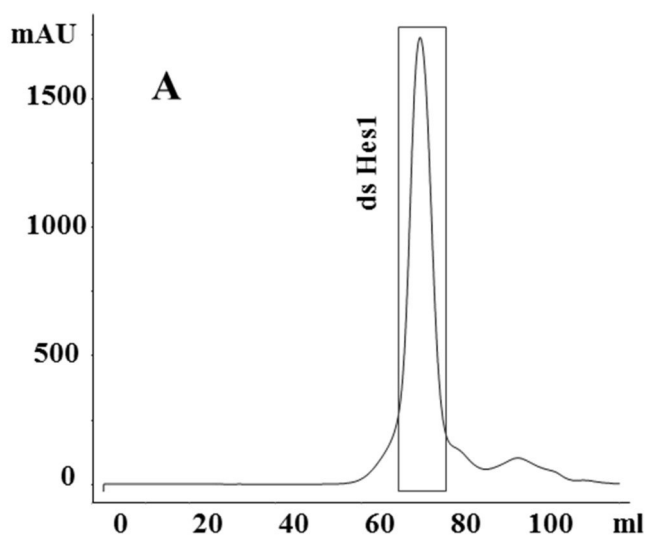


Figure 7.36 Purification of ds Hes1 and Stt3b by cation by SEC, fractions corresponded under box area were pooled for HSQC experiments.

A ^{15}N -HSQC titration of MyT1_{F4-7} at $\sim 120 \mu\text{M}$ was recorded, and then further spectra were recorded after 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 molar equivalents (ME) of Hes1 were added. A strong

change in the intensities of signals can be seen between the free protein and the protein titrated with 0.25 molar equivalents of ds DNA (Figure 7.37).

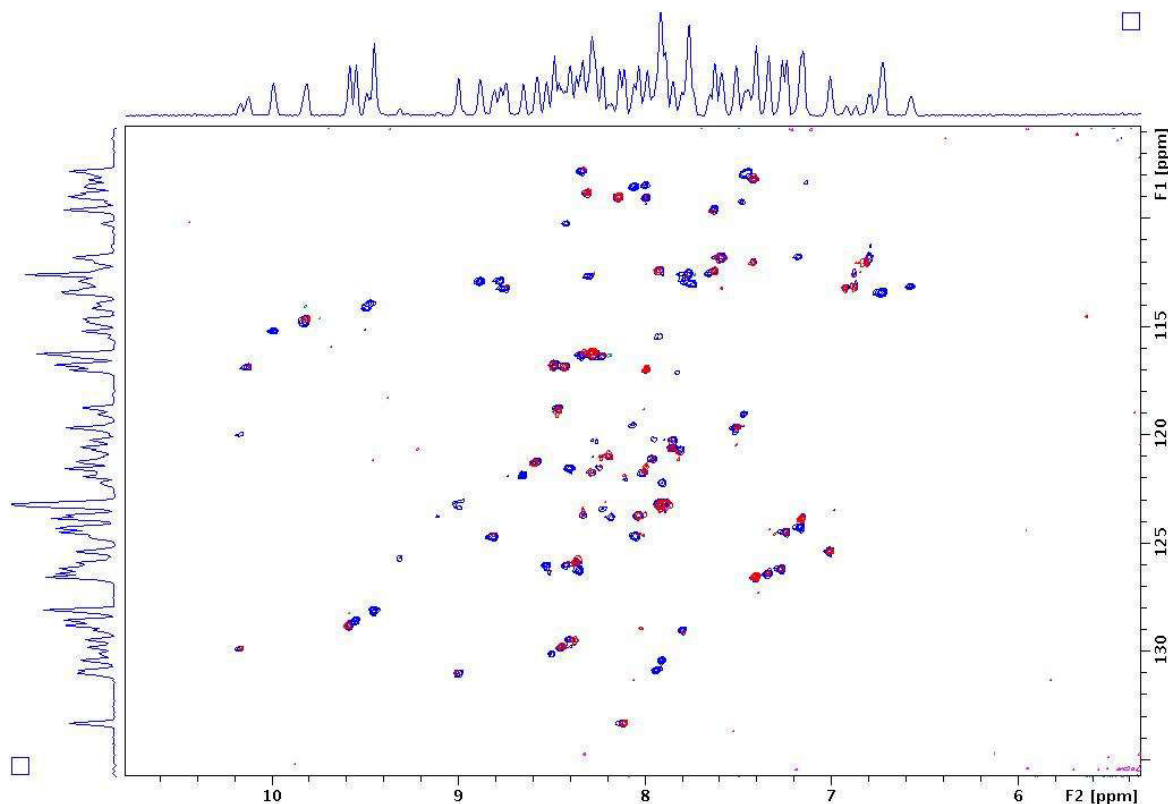


Figure 7.37 ^{15}N -HSQC spectra recorded of MyT1_{F4-7} following the addition of 0 (blue) and 0.25 (red) molar equivalents of ds Hes1 (5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'). Titration was carried out in SEC buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM TCEP). Spectra were recorded at 800 MHz and RT.

Examination of the spectra revealed that a considerably number of the peaks had disappeared by 0.5 molar equivalents of DNA, and that the big majority of peaks disappear after 0.75 equivalents and they did not reappear after 1 equivalent (Figure 7.38). These patterns suggest that the MyT1_{F4-7}-DNA interaction might be in intermediate exchange on the chemical shift timescale, or might possibly be forming large soluble aggregates.

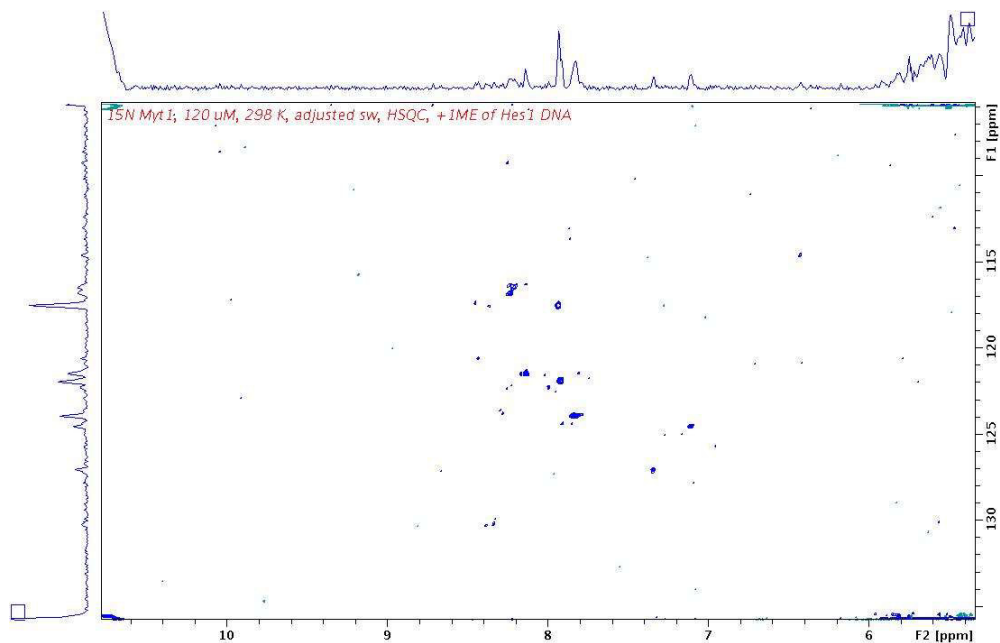


Figure 7.38 ^{15}N -HSQC spectra recorded of MyT1_{F4-7} following the addition of 1 molar equivalents of Hes1 (5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'). Titration was carried out in SEC buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM TCEP). Spectra were recorded at 800 MHz and RT.

A ^1H NMR spectrum was recorded after each addition of Hes1. ^1H NMR shows that after the addition of 0.25 Hes1 ME, the peaks were significantly broader and after 0.5 Hes1 ME, signals were completely broadened; however there was no evidence of precipitation (Figure 7.39).

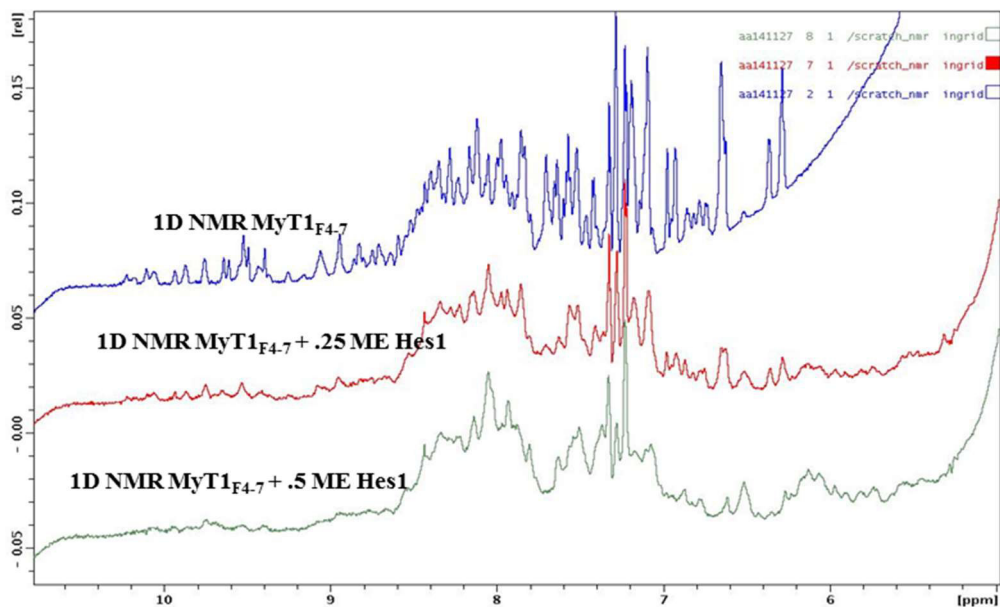


Figure 7.39 ^1H NMR spectrum of MyT1_{F4-7} following the addition of 0 (blue), 0.25 (red) and 0.5 (green) molar equivalents of ds Hes1. The spectrum was acquired at RT °C on an 800 MHz spectrometer.

These spectra cannot be used to easily assess the binding interface between Hes1 and MyT1_{F4-7}. In order to acquire additional data, Hes1 and MyT1_{F4-7}-Hes1 titration sample (1 ME of MyT1_{F4-7}:Hes1) were subjected to SEC-MALLS to measure its MW and elucidate its possible oligomerization state. Hes1 at a concentration of 1200 μ M was analysed and an average MW of 11.21 kDa (\pm 34.5%) was calculated in the center of the peak (1.73-1.85 mL), which was comparative with the predicted value 13.44 kDa (Figure 7.40A). MyT1_{F4-7}-Hes1 mixture at a concentration of 120 μ M show an average MW of 29.14 kDa (\pm 1.4%) in the center of the peak (1.65-1.90 mL), which was in fairly good agreement with the predicted value 33.24 kDa (5.40B); suggesting a 1:1 binding interaction. Worth to mention that at these concentrations, the UV signal at 260 and 280 nm is out of detector range.

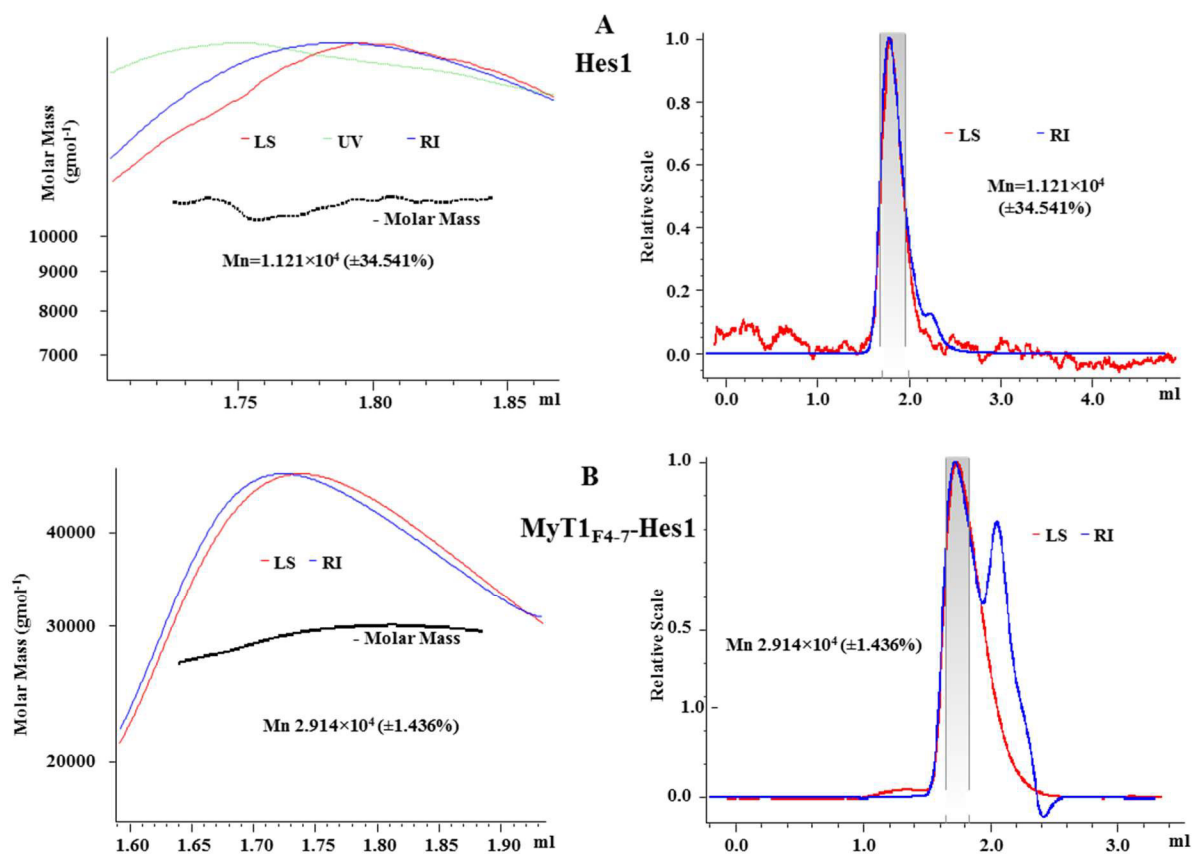


Figure 7.40 SEC-MALLS analysis of A) HES1 and B) MyT1_{F4-7}-Hes1 interaction (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8.0 at RT)

Microscale thermophoresis (MST)

As mentioned before, several studies have shown that retinoic acid receptor (RARE) motif (AAGTT) could bind two MyT1-type ZnFs. In order to analyse the possibility that DNA with two RARE motifs like Hes1 (a transcriptional repressor that influences cell proliferation and differentiation in embryogenesis [244]) and stt3b (this gene mediate posttranslational glycosylation [245]) could bind the four ZnFs of MyT1_{F4-7}, a MST assays were performed.

MST assays were used to determine the MyT1_{F4-7} dissociation constants with fluorescent labelled Fl-Hes1 (ds Fl-5'-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3'; 3'6-FAMTM modification, Integrated DNA Technologies, Inc. Iowa, USA) and Fl-Stt3b (ds Fl-5'-GACAAAGTTTGGTCCAAGTTGGCT-3') which potentially could bind four zinc fingers (underline letters). After annealing, Fl-Hes1 and Fl-Stt3b were purified by SEC (Figure 7.41) and concentrated until they reached 248 and 303 μ M respectively (as stock solutions; concentration correction for fluorescent tags is show in Appendix 4).

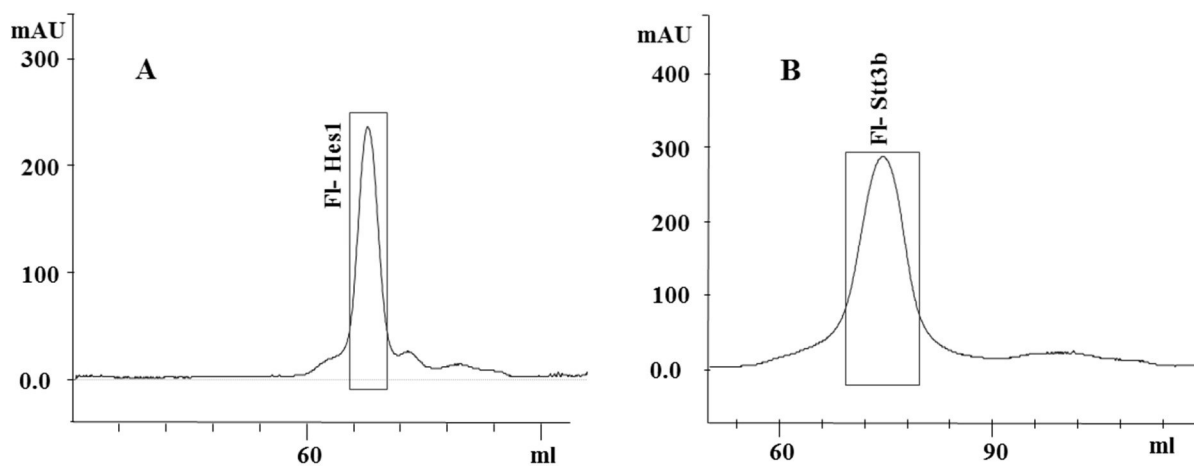


Figure 7.41 Purification of ds Fl-Hes1 and Fl-Stt3b by cation by SEC, fractions under the boxed area were pooled for MST assays.

MST assays were performed starting with 25 μ M of protein (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8). Serial dilutions (2:1 and 3:1) were done to give 16 samples. Fluorescence labelled DNA was added to each protein dilution to a final concentration of 20 nM and samples were put in capillaries. Assays were run with LED power at 80% and MST power at 60% and the

thermophoresis (with or without jump) for each point of the titration was plotted as a function of protein concentration.

MyT1_{F4-7}-Fl-Hes1 binding curves exhibited intra-day reproducibility but complex binding behaviour (Figure 7.42). Fitting the 1:1 model for the first binding event alone produced a dissociation constant of 240 nM, comparable with a previous report for MyT1(ZnF4-5) of 270 nM [232]. Nevertheless, the consistency of this fit is uncertain because the first binding event does not reach a clear plateau before the effects of other interaction events arise at higher concentrations (Figure 7.43).

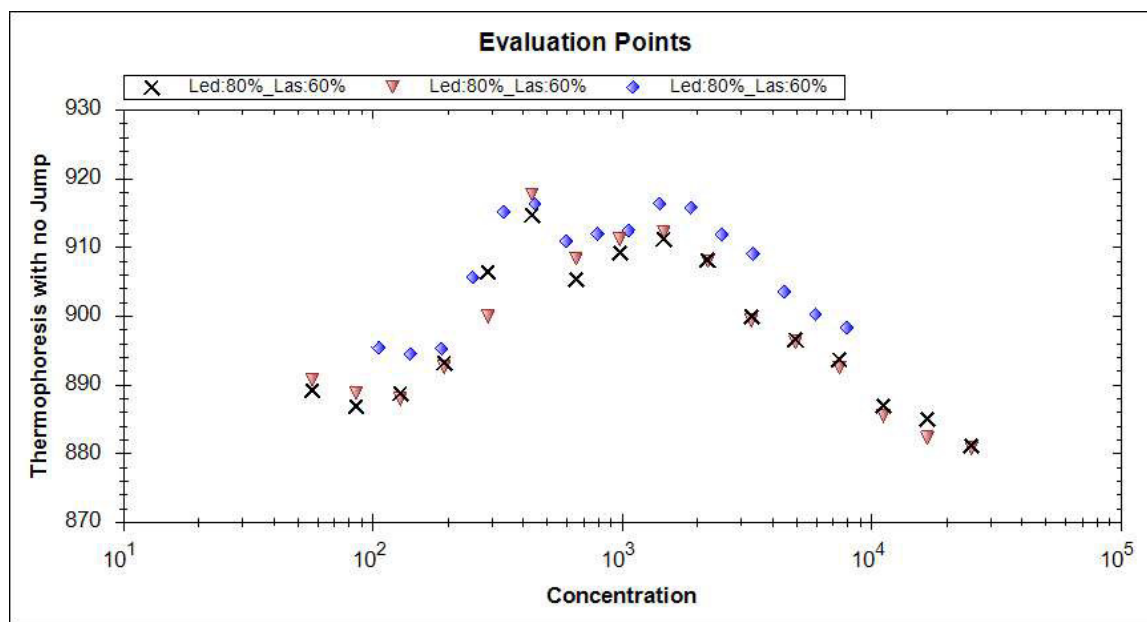


Figure 7.42 MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1_{F4-7}. Red triangles and black marks are a duplicate experiment in a 2:1 dilution; meanwhile the blue diamonds are a 3:1 dilution of the stock solution (Fl-Hes1 concentration was fixed at 20 nM; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT).

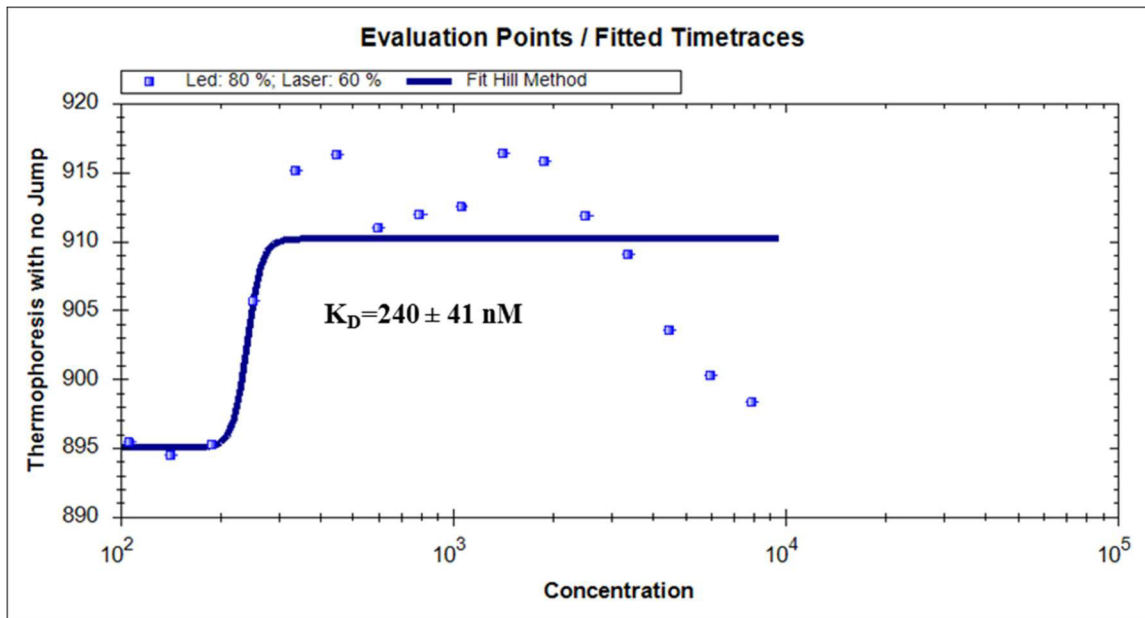


Figure 7.43 MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1_{F4-7} with fit shown. (Fl-Hes1 concentration was fixed at 20 nM in a 2:1 dilution of MyT1_{F4-7}; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT). The reliability of this fit is not high because the first binding event is affected by other interaction events at higher concentrations.

MyT1_{F4-7}-Fl-Stt3b binding curves were moderately fitted by a simple 1:1 binding isotherm model for the first binding event yielded a dissociation constant of 178 nM. (Figure 7.44).

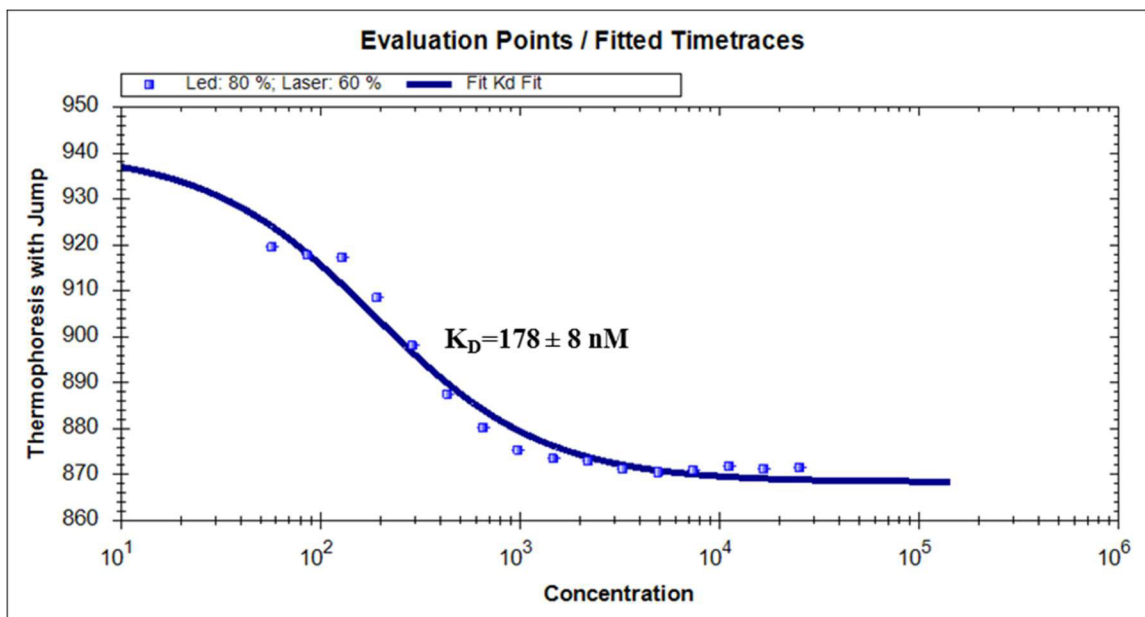


Figure 7.44 MST data corresponding to thermophoresis plotted as a function of concentration of MyT1_{F4-7} with fit shown. (Fl-Stt3b concentration was fixed at 20 nM in a 2:1 dilution of MyT1_{F4-7}; 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8 at RT).

VII.2.5 Conclusions

Expression of MyT1_{F4-7} seems to be reasonable in HEK293FT cells; however expression using pMAL-MyT1_{F4-7} fusion protein (bacterial system) gave also good expression in soluble fraction. Perhaps surprisingly, better yield and purity was achieved when expression was induced in minimal media.

The NMR spectra show that MyT1_{F4-7} appears to be folded and ¹⁵N-heteronuclear single quantum coherence (HSQC) experiments show a strong change in the intensities of peaks after addition of 0.25 molar equivalents of Hes1; this result suggests a strong interaction between the protein and DNA.

SEC-MALLS data show that MyT1_{F4-7} most likely forms a 1:1 complex with Hes1 and this complex is stable and able to be purified by SEC.

The MST results for MyT1_{F4-7} indicate a complex binding behaviour with Hes1 due to possible interactions with more than two ZnFs at {MyT1_{F4-7}} > 300 nM. Nevertheless Stt3b indicate a simple 1:1 binding. It is worth mentioning that at {MyT1_{F4-7}} > ~4 μM the presence of another binding event seems to take place. This complex behaviour in both Hes1 and Stt3b reduces confidence in the calculated K_D. An interesting experiment would be to carry out more MST assays with DNA holding the two RARE motifs but with a different number of nucleotides that link them.

Appendix 1. Oligonucleotides used for PCR, HSQC and MST assays.

Name	Sequence 5'-3'	Supplier	ϵ l mol ⁻¹ cm ⁻¹
Hes1Fwd	AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC	Integrated DNA Technologies, Inc.(IDTDNA)	226600
Hes1Rev	GTGAAACTTCCCAAACCTTTCTT	IDTDNA	202600
Stt3bFwd	GACAAAGTTTGGTCCAAGTTGGCT	IDTDNA	233000
Stt3bRev	AGCCAACCTTGGACCAAACCTTTGTC	IDTDNA	226800
Fl-Hes1Fwd	Fl-AAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC	IDTDNA	247560
Fl-Stt3bFwd	Fl-GACAAAGTTTGGTCCAAGTTGGCT	IDTDNA	254000
T7 Fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	Sigma-Aldrich	na
MALE Fwd	GGTCGTCAGACTGTCGATGAGCC	Sigma-Aldrich	na
Myt1_ZnF4_Fwd	GCGAATTCTTATCATTAACC	Sigma-Aldrich	na
Myt1_ZnF7_Rev	GCGAATTCTTATCATTAACC	Sigma-Aldrich	na

Appendix 2. Properties of MyT1_{F4-7} (ProtParam tool in ExPASy)

Sequence

GPGSKDIKKE LLTCPTPGCD GSGHITGNYA SHRSLSGCPL ADKSLRNLMA
 AHSADLKCPT
 PGCDGSGHIT GNYASHRSLG GCPRAKKSGL KVAPTKDDKE DPELMKCPVP
 GCVGLGHISG
 KYASHRSASG CPLAARRQKE GALNGSSFSW KSLKNEGPTC PTPGCDGSGH
 ANGSFLTHRS
 LSGCPRATFA GKKG

Number of amino acids: 194

Molecular weight: 19898.4 Da

Formula: C₈₄₂H₁₃₅₆N₂₆₄O₂₆₇S₁₄

Theoretical pI: 9.27

Amino acid composition: Ala (A) 16 8.2%, Arg (R) 9 4.6%, Asn (N) 6 3.1%, Asp (D) 9 4.6%, Cys (C) 12 6.2%, Gln (Q) 1 0.5%, Glu (E) 5 2.6%, Gly (G) 28 14.4%, His (H) 9 4.6%, Ile (I) 4 2.1%, Leu (L) 16 8.2%, Lys (K) 17 8.8%, Met (M) 2 1.0%, Phe (F) 3 1.5%, Pro (P) 16 8.2%, Ser (S) 24 12.4%, Thr (T) 10 5.2%, Trp (W) 1 0.5%, Tyr (Y) 3 1.5%, Val (V) 3 1.5%, Pyl (O) 0 0.0%, Sec (U) 0 0.0%.

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 14; Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 26

Extinction coefficients:

Ext. coefficient 10720 M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water. Abs 0.1% (=1 g L⁻¹) 0.539, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 9970 M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water. Abs 0.1% (=1 g L⁻¹) 0.501, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro), >20 hours (yeast, in vivo), >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 42.06 (this classifies the protein as unstable).

Aliphatic index: 52.94

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.590

Appendix 3. Sequencing results of the construction plasmids. (In bold MyT1_{F4-7} sequence)

pMAL-MyT1_{F4-7}

GCGGTGCGCGCAGACTATTCGAGCTCGAACACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGCCATGGGGGCTCGAAGTACTCT
TTCAAGGACCCGGATCCAAAGACATCAAAAAAGAACTGCTGACCTGTCCGACACCCGGTTGTGATGGTAGCGGTTCATATTA
CCGGCAATTATGCAAGCCATCGTAGCCTGAGCGGTTGCCGTGAGATAAAAAGCCTGCGTAATCTGATGGCAGCACAT
AGCGCAGATCTGAAATGTCCGACCCCTGGTTGCGACGGTTCAGGCCATATTACAGGTAACATGCGCTCACATCGTAGTCT
GTCAGGCTGTCCGCGTGCAAAAAAAGCGGTCTGAAAGTTGCACCGACCAAAGATGATAAAGAAGATCCGGAAGTATGA
AATGCCCTGTCCGGTTGCGTTGGTCTGGGTTCATATTTCTGGTAAATATGCCAGTCATCGTAGTGCAAGCGGCTGCCCTC
TGGCAGCACGTCGTCAGAAAGAAGGTGCACTGAACGGTAGCAGCTTTAGCTGGAAAAGCCTGAAAAATGAAGGTCCGACA
TGCCCGACCCAGGCTGTGATGGCTCAGGTCATGCAAATGGTAGCTTTCTGACCCATCGTTCAGTCTGGTTGTCCTCGT
GCCACCTTTCAGGTAATAAAGGTTAATGATAAGAATTCTGCAGGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC
TGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA
CCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCAATGGCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGATAAGATTTTCAGCCTG
ATACAGATTAATCAGAACGCAGAAAGCGGTCTGATAAAAAGAAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCC
ATGCCGAATCAGAAGTAAACGCCGTAACGCCGATGGTAGTGTGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCA
AATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTTATCTGTTGTTGCGGGTGAACGCTCTCTGAATAGGACAAATC
CGCCGGGAACGGATTTGAACTTTTCGACACGCCCCCCCCGAAAGTGTGGCGGGGACGGAAGGGGGGCCCGATGG

pGEX-MyT1_{F4-7}

GTCTCTCAATCGGATCTGGAGTTCTGTTTCAGGGGCCCTGGGATCCAAAGACATCAAAAAAGAACTGCTGACCTGTCCGACA
CCGGTTGTGATGGTAGCGGTTCATATTACCGCAATTATGCAAGCCATCGTAGCCTGAGCGGTTGCCGTGAGATAA
AAGCCTGCGTAATCTGATGGCAGCACATAGCGCAGATCTGAAATGTCCGACCCCTGGTTGCGACGGTTCAGGCCATATTA
CAGGTAACATGCGCTCACATCGTAGTCTGTCAGGCTGTCCGCGTGCAAAAAAAGCGGTCTGAAAGTTGCACCGACCAA
GATGATAAAGAAGATCCGGAAGTATGAAATGCCCTGTTCCGGTTGCGTTGGTCTGGGTTCATATTTCTGGTAAATATGCC
AGTCATCGTAGTGCAAGCGGCTGCCCTCTGGCAGCACGTCAGAAAGAAGGTGCACTGAACGGTAGCAGCTTTAGCTG
GAAAAGCCTGAAAAATGAAGTCCGACATGCCCCGACCCAGGCTGTGATGGTTCAGGTCATGCAAATGGTAGCTTTCTGA

CCCATCGTTCACTGTCTGGTTGTCCTCGTGCCACCTTTGCAGGTAATAAAGGTTAATGATAAGAATTCATCGTGACTGACTG
 ACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
 CGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTA
 GCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTT
 TCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTCCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
 CGCTCATGAAACAATAAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATTATGAGTATTCAAACATTTCCGTGTCGCC
 CTTATTTCCGTTTTTTGCGGCATTTTTGCCTTTCTGGTTTTTGTCCACCAAAAGAGCTGGGTAAAATTAAGATGCCTGAAAATA
 CAGTAGGATGCACCCAAAGGGGTTACTTCCACAACCTGGAATTCACAGACCGTTGAAGAACGTTGAGATGTTTTCCACCCAGA
 CAGAAGCTATTGAGAATGATGAACAGACGTAGTAAAATTGCTTGGTTATTGGAAGGGGAGAATTGCCCCCGTACTGACCAGTCAG
 AACGGAGAACTCCCCCGCCCCCTCCAACGCATTTCTAAAAATATAAATTGGGATTGGACGATCTACCTACCTAAAGTCGAAT
 GA

PCDNA 3.1-MyT1_{F4-7}

TTAGCATGCTCGAGCTCGGATCAGCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGATCCAAAGACATCAAAAAAGAACTGCTG
 ACCTGTCCGACACCGGGTTGTGATGGTAGCGGTCATATTACCGCAATTATGCAAGCCATCGTAGCCTGACCGGTTGTCC
 GCTGGCAGATAAAAAGCCTGCGTAATCTGATGGCAGCACATAGCGCAGATCTGAAATGTCCGACCCCTGGTTGCGACGGTT
 CAGGCCATATTACAGGTAACATATGCCTCACATCGTAGTCTGTGACGGCTGTCCGCGTGCAAAAAAAGCGGTTGAAAGTT
 GCACCGACCAAAGATGATAAAGAAGATCCGGAACTGATGAAATGCCCTGTTCGGGTTGCGTTGGTCTGGGTCATATTT
 TGGTAAATATGCCAGTCATCGTAGTGCAAGCGGCTGCCCTCTGGCAGCACGTCGTCAGAAAGAAGGTGCACTGAACGGTA
 GCAGCTTTAGCTGGAAGCCTGAAAAATGAAGGTCCGACATGCCCGACCCAGCCTGTGATGGCTCAGGTCATGCAAAT
 GGTAGCTTTCTGACCATCGTTCACTGTCTGGTTGTCCTCGTGCCACCTTTGCAGGTAATAAAGGTTAATGATAAGAATTC
 TGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCACCTAAATGCTAGAGCTCGCT
 GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGGTGCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTC
 CACTGTCTTCTCAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCGTGGGGGTTGGAGTTGGG
 GA

Appendix 4. Determination of concentration for fluorescent labelled DNA.

Parameter	Fl-Hes1	Fl-Stt3b
ϵ Fl λ_{495} $\text{lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	75000.0	75000.0
ϵ Fl λ_{260} $\text{lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	20960.0	20960.0
ϵ DNA λ_{260} $\text{lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	341604.0	375886.5
Abs Fl-DNA λ_{260}	90.1	119.5
Abs Fl-DNA λ_{495}	19.5	20.5
{Fl} (μM)	259.7	273.3
Abs Fl λ_{260}	5.4	5.7
Abs DNA λ_{260}	84.7	113.8
Stock {DNA} (μM)	247.8	302.7

Received: 19 August 2015

Revised: 23 October 2015

Accepted: 25 October 2015

Published online in Wiley Online Library

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 1–12
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.7440

Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles

Armando Alcazar Magana, Kazimierz Wrobel, Alma Rosa Corrales Escobosa and Katarzyna Wrobel*

Chemistry Department, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000, Guanajuato, Mexico

RATIONALE: A full understanding of the biological impact of nanomaterials demands analytical procedures suitable for the detection/quantification of epigenetic changes that occur in the exposed organisms. Here, the effect of CuO nanoparticles (NPs) on global methylation of nucleic acids in *Lepidium sativum* was evaluated by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. Enhanced selectivity toward cytosine-containing nucleosides was achieved by using their proton-bound dimers formed in positive electrospray ionization (ESI(+)) as precursor ions for multiple reaction monitoring (MRM) quantification based on one or two ion transitions.

METHODS: Plants were exposed to CuO NPs (0–1000 mg L⁻¹); nucleic acid extracts were washed with bathocuproine disulfate; nucleosides were separated on a Luna C18 column coupled via ESI(+) to an AmaZon SL mass spectrometer (Bruker Daltonics). Cytidine, 2'-deoxycytidine, 5-methylcytosine, 5-methyl-2'-deoxycytidine and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine were quantified by MRM based on MS³ ([2M+H]⁺/[M+H]⁺/[M+H-132]⁺ or [M+H-116]⁺) and MS² ([2M+H]⁺/[M+H]⁺).

RESULTS: Bathocuproine disulfate, added as Cu(I) complexing agent, allowed for elimination of [2M+Cu]⁺ adducts from the mass spectra. Poorer instrumental detection limits were obtained for MS³ (20–120 fmol) as compared to MS² (9.0–41 fmol); however, two ion transitions helped to eliminate matrix effects in plant extracts. The procedure was tested by analyzing salmon sperm DNA (Sigma) and applied for the evaluation of DNA and RNA methylation in plants; in the absence of NPs, 13.03% and 0.92% methylated cytosines were found in DNA and RNA, respectively; for NPs concentration >50 mg L⁻¹, DNA hypomethylation was observed with respect to unexposed plants. RNA methylation did not present significant changes upon plant exposure; 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine was not detected in any sample.

CONCLUSIONS: The MRM quantification proposed here of cytosine-containing nucleosides using their proton-bound homo-dimers as precursor ions proved its utility for the assessment of global methylation of DNA and RNA in plants under stress imposed by CuO NPs. Detection of copper adducts with cytosine-containing ions, and their elimination by washing extracts with Cu(I) chelator, calls for further investigation. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Engineered nanomaterials constitute an invaluable aid to man in countless industrial applications, in medicine and in the protection of plants against plagues. At the same time, ever increasing exposure of living organisms to these nano-size products has aroused a concern related to their potentially adverse environmental and human health effects.^[1,2] Plants are important targets of nanoparticles (NPs); the related studies have been focused mainly on their uptake, translocation, solubilization/metabolization, interaction with biomolecules and induction of oxidative stress.^[3–6] The impact of nanomaterials on epigenetic events has also been

addressed and the need for reliable quantitative data and for mechanistic insight into the observed effects has been highlighted.^[4,7–10] This topic is of interest, because dynamic changes in plant DNA methylation (methyl group reversibly attached to the carbon 5 position in the pyrimidine ring of cytosine residues, 5mC) are considered a source of heritable phenotypes; therefore, the total amount of methylated cytosines and the site-specific methylation profiles are thought to play important roles in environmental responses of these organisms, their adaptation and evolution.^[11,12] Nonetheless, global methylation, defined as the percentage of methylated cytosines in genomic DNA, has rarely been evaluated in plants exposed to nano-size materials.^[13,14]

Dynamic changes in DNA methylation rely on the methylation and demethylation mechanisms. In mammals, the important demethylation pathway involves 10–11 translocation proteins that catalyze 5mC oxidation to

* Correspondence to: K. Wrobel, Chemistry Department, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico. E-mail: katarzyn@ugto.mx

5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5hmdC), 5-formyl-2'-deoxycytidine and 5-carboxyl-2'-deoxycytidine.^[15] Accordingly, 5hmdC has been proposed as an epigenetic biomarker for exposure to environmental toxins.^[16–18] In plants, the demethylation pathway is less complex as compared to animals; 5mdC moieties are recognized and excised from DNA by the family of DNA glycosylases.^[19] Although 5hmdC is not an intermediate of DNA demethylation in plants, it can be generated in the presence of reactive oxygen species and the feasibility of its removal by plant enzymatic system has recently been addressed.^[20] It should also be stressed that controversial data on the presence of 5hmdC in plants can be found in the literature.^[20,21] *In vivo* toxicity of nanoparticles often manifests via oxidative damage,^[4,22,23] therefore, 5hmdC might be produced in the exposed plants.

Non-coding ribonucleic acids participate in epigenetic regulation of gene expression.^[24] Some authors suggested that 5-methylcytidine (5mC) found in ribosomal, transfer, messenger and a variety of small RNAs^[25,26] might be involved in the mechanisms underlying epigenetic inheritance.^[27,28] Our recent study revealed changes in global methylation of ribosomal RNA in *Lepidium sativum* in response to abiotic stress imposed by divalent cadmium.^[29]

The present work was undertaken in order to develop a relatively simple and reliable procedure, suitable for the evaluation of the effect that metal-containing NPs may have on global DNA methylation and hydroxymethylation, and methylation of total RNA in plants. To this end, *Lepidium sativum* was grown hydroponically in the presence of cupric oxide NPs that were selected due to their extensive use and also because of numerous toxic effects related to non-homeostatic concentrations of copper in living organisms. Noteworthy, translocation, biotransformation and toxicity of CuO NPs have been studied in different plant models,^[6,22,30–32] yet information about their potential impact on the methylation of nucleic acids in the exposed plants is scarce.^[14]

Analytical methodology available for DNA methylation/hydroxymethylation has been described in a few comprehensive reviews and in the introductory parts of several research articles.^[33–39] The current approach relies on the enzymatic hydrolysis of DNA and separation of the obtained nucleosides by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection.^[34,38,40,41] When a conventional low-resolution ion trap instrument is used, multiple reaction monitoring (MRM) helps to achieve high sensitivity and selectivity required when small sample amount is available and when real-world materials with complex chemical matrix are analyzed. The complete isolation of DNA from RNA is not necessary because modified and non-modified deoxyribonucleosides/ribonucleosides can be determined in a single run,^[35] furthermore, simultaneous assessment of global DNA methylation/hydroxymethylation and total RNA methylation becomes possible, in line with the aim of the present work.

Formation of the cytidine proton-bound dimer (CH⁺C) has been reported as an obstacle in ESI-MS analysis and the instrumental conditions were optimized to minimize this process.^[35,42,43] On the other hand, the experimental data and theoretical calculations revealed that cytosine dimers are bound more strongly as compared to those of other nucleobases (computed interaction energy for cytosine dimer

44.8 kcal mol⁻¹) and their formation in the gas phase is promoted by slight acidification of the solution.^[44,45] The original idea of this work was to use proton-bound dimers as precursor ions for chromatographically separated cytidine (C), 5mC, 2'-deoxycytidine (dC), 5mdC and 5hmdC and to evaluate the feasibility of MRM quantification based on one and two ion transitions for each of these compounds (protonated dimer – protonated monomer and protonated dimer – monomer – product ion obtained after glycosidic cleavage, respectively) in the analysis of several nucleic acid hydrolyzates from plants exposed to different concentrations of CuO NPs.

EXPERIMENTAL

Apparatus

An UltiMate 3000 liquid chromatograph (Dionex, Thermo Scientific) equipped with a binary pump, a degasser, a thermostatted column compartment and an autosampler was on-line coupled to an ion trap mass spectrometer (AmaZon SL) fitted with an ESI source (Bruker Daltonics). The LC/MS system was controlled by Hystar V3.2 where the data were processed by Data Analysis V4.1 SP2 and QuantAnalysis V2.0 SP2 (Bruker Daltonics). The chromatographic column was a Luna C18 (150 × 2 mm, 3 μm) from Phenomenex; the procedure is abbreviated as HPLC/ESI-ITMS.

A model 7500ce inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a Meinhard nebulizer and Peltier-cooled spray chamber (2 °C) was used.

An Agilent series 1200 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, a well plate autosampler, diode-array spectrophotometric detector and controlled by Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used. The chromatographic column was a Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) from Phenomenex. This configuration is referred to throughout the text as HPLC-DAD.

A Spectronic 3000 diode-array Milton Roy spectrophotometer (resolution 0.35 nm, Milton Roy Inst. Co.) and chlorophyll meter SPAD-502 (Minolta Co. Ltd, Osaka, Japan) were also used.

Reagents

All chemicals were of analytical reagent grade (Sigma-Aldrich). HPLC grade acetonitrile, ethanol, isopropanol (Fisher Scientific) and deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) were used throughout.

The standards 2'-deoxycytidine (dC), 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC), 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5hmdC), cytidine (C), 5-methylcytidine (5mC), 2'-deoxyadenosine (dA), 2'-deoxyguanosine (dG), thymidine (T), adenosine (A), guanosine (G) and uridine (U) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cupric oxide nanoparticles were purchased from Sigma: CAS 1317-38-0, TEM particles size <50 nm.

The stock standard solution of copper (1000 mg L⁻¹) was purchased from Sigma. The ICP-MS tuning solution (Li, Mg, Y, Ce, Tl, Co, 10 mg L⁻¹ each) and internal standard mix (Li, Sc, Ge, Y, In, Tb, Bi, 10 mg L⁻¹ each) were from Agilent Technologies.

Other Sigma reagents were: tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), formic acid, ammonium formate, acetic acid, nitric acid, hydrochloric acid, hydrogen peroxide, sodium hydroxide, sodium chloride, calcium chloride, sodium hypochlorite, magnesium chloride, zinc chloride, sodium dodecyl sulfate, glycine, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), bathocuproine disulfonic acid, components of Hoagland solution,^[46] proteinase K, DNase I and nuclease P1. Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) was from Sigma.

Plant growth

Lepidium sativum cv. *Ogrodowa* seeds from a garden-specialized market in Poland were used; the growth conditions were adopted from the previous study.^[47] In brief, sterilized seeds (70% ethanol, 3 min; 3.1% sodium hypochlorite, 15 min) were washed and soaked in deionized water for 1 h and then germinated in Hoagland's nutrient solution during 1 week.^[46] The obtained seedlings were divided into six groups (250 seedlings per group); each group was grown hydroponically in 100 mL of Hoagland solution amended with 0; 5; 10; 50; 250 or 1000 mg L⁻¹ of CuO NPs during 1 week. Fifteen chlorophyll measurements were obtained for randomly selected leaves of plants in each group. The whole plants were harvested, washed with calcium chloride (0.05 mol L⁻¹) and with deionized water (ultrasonic bath, 5 min). About half of the biomass of each plant group were frozen (-20 °C). Another portion of the biomass was freeze-dried. Spent media were centrifuged (12 000 g, 15 min) and the obtained supernatants were frozen (-20 °C).

ICP-MS determination of total copper

An aliquot (30 mg) of each freeze-dried biomass or spent medium supernatant (30 µL) was placed in a polypropylene Eppendorf tube. Then 200 µL of the internal standard mix and 800 µL of concentrated nitric acid were added, and the sample was heated 1 h at 70 °C followed by 2 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 500 µL of hydrogen peroxide were added and the sample was kept at 120 °C during 1 h. Finally, the volume was adjusted to 1.5 mL and 25 µL were taken and diluted to 5 mL. The ICP-MS operating conditions were as follows: forward power 1500 W, plasma gas flow rate 15 L min⁻¹, carrier gas flow rate 0.89 L min⁻¹, make-up gas flow rate 0.15 L min⁻¹, sampling depth 8 mm, platinum sampling and skimmer cones, dwell time 100 ms per isotope, collision/reaction cell gas He, 4.5 mL min⁻¹. The isotopes ⁶³Cu, ⁶⁵Cu were monitored (¹¹⁵In as IS). Five-point external calibration was performed at element concentration levels 0–100 µg L⁻¹ with the addition of the internal standard (4.0 µg L⁻¹ In). The linear regression functions were obtained (r² > 0.999) and the evaluated instrumental detection limit for ⁶³Cu was 1.8 ng L⁻¹. The analytical accuracy was demonstrated by analyzing two certified reference materials NIST 1643d (21.2 ± 0.9 µgCu L⁻¹ determined; certified value 20.5 ± 3.8 µgCu L⁻¹) and NIST 1572 (16.1 ± 0.4 µgCu g⁻¹ determined; certified value 16.5 ± 1.0 µgCu g⁻¹).

Extraction and hydrolysis of nucleic acids

The extraction procedure reported by Aljanabi and Martinez^[48] was used as described in the previous study.^[29] For each plant exposure conditions, the extraction was repeated in triplicate. In brief, ten thawed seedlings (about 500 mg wet biomass) were homogenized with 500 µL of extraction buffer containing sodium chloride 250 mmol L⁻¹, EDTA 100 mmol L⁻¹, Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ at pH 8 (polythron). Afterwards, 40 µL of sodium dodecyl sulfate 20% (m/v), 8 µL of proteinase K 20 mg L⁻¹ were added, the mixture was incubated for 1 h at 60 °C, 300 µL of sodium chloride 6 mol L⁻¹ were added and the sample was centrifuged at 10 000 g for 30 min. The supernatant was collected, 500 µL of isopropanol were added prior to freezing at -20 °C for 1 h to complete the precipitation. Subsequently, it was centrifuged (10 000 g, 20 min, 4 °C), the supernatant was eliminated and the pellet was washed with two 500 µL portions of ethanol 70% (v/v). The washing was repeated with another two portions of ethanol 70% containing bathocuproine disulfonic acid 10 mmol L⁻¹ (pH 5.6 with ammonium formate) and finally with ethanol 70%. To check the purity of the nucleic acids, several randomly selected pellets were dissolved in 50 µL of deionized water and UV absorption spectra were acquired (220–350 nm); the ratio A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.7 was always obtained.^[49,50] Based on the absorbance measurements at 260 nm, about 50 µg of nucleic acids were extracted per sample (500 mg wet biomass).

For enzymatic hydrolysis, the protocol reported by Rozhon *et al.* was adopted.^[39] Each extract of nucleic acids was brought to a volume of 42 µL with deionized water, 5 µL of the hydrolysis buffer was added (acetic acid 0.2 mol L⁻¹, glycine 0.2 mol L⁻¹, magnesium chloride 50 mmol L⁻¹, zinc chloride 5 mmol L⁻¹, calcium chloride 2 mmol L⁻¹, pH 5.3). The sample was incubated with 2 µL of DNase I (10 U µL⁻¹) and 1 µL of nuclease P 1 (1.25 U µL⁻¹) at 37 °C during 12 h, then were heated in a boiling water bath for 5 min and cooled rapidly on ice to avoid possible contamination by microorganisms. Afterward, 5 µL of sodium hydroxide 100 mmol L⁻¹ were added together with 2 µL of alkaline phosphatase (1 U µL⁻¹) and the sample was incubated at 37 °C for 2 h. Finally, the volume was brought to 200 µL with chromatographic phase A (ammonium formate 5 mmol L⁻¹).

HPLC/ESI-ITMS procedure

The samples and calibration solutions were filtered (0.22-µm Whatman filters) and injected into the chromatographic system (2 µL, about 500 ng of nucleic acids). Separation of 11 ribonucleosides and deoxyribonucleosides was carried out on a Luna C18 column (150 × 2 mm, 3 µm) at 35 °C and the total flow rate 0.15 mL min⁻¹. Linear gradient elution with two mobile phases (A, ammonium formate 5 mmol L⁻¹; B, acetonitrile with formic acid 0.1% v/v) was as follows: 0 min 3% B, 15 min 30% B, 18 min 80% B, 20 min 3% B.

Column effluent was introduced into the ESI source operated in positive ion mode with the following parameters: spray voltage 4500 V; plate voltage 500 V; nebulizer gas pressure 1.8 bar (N₂); drying gas 6 L min⁻¹ (N₂); source

temperature 200 °C and capillary exit voltage 140 V. Mass spectra were obtained by means of an UltraScan mode in the m/z scan range 100–600, with an ion charge control (ICC) target setting 100 000, maximum accumulation time 70 ms, two averages per experiment and a rolling averaging of one. The instrument was externally calibrated with low concentration ESI-MS tuning mix (Agilent). The smart parameter settings (SPS) was used for automatic optimization of the trap drive level for m/z 250, compound stability 100%, trap drive level 100%. Helium was used as the collision gas; MS² and MS³ spectra of the precursor ions were obtained with these same ICC setting as for MS and with single average per experiment. For MRM quantification, an isolation width of $m/z \pm 2$ was applied for each ion with 100 ms dwell time; the fragmentation amplitudes were 0.5 V; Bruker QuantAnalysis software was used, taking the peak area of the quantifier ions from respective MRM chromatograms. The parameters used for quantification of individual compounds are summarized in Table 1.

In order to cover the expected range of nucleosides in the plant samples, a series of calibration solutions contained 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 ng of each compound as referred to the injection volume 2 μ L. Recovery experiments were carried out for plants exposed to 50 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹ CuO NPs. Two 50- μ L aliquots of each sample were four times diluted; one with the mobile phase A and the second was spiked with 10 μ L of standard mix (5 μ g mL⁻¹) and brought to 200 μ L with mobile phase A. Three replicates of each analysis were carried out.

HPLC-DAD analysis

DNA methylation was evaluated using the procedure reported previously.^[36] The column was thermostatted at 35 °C, gradient elution was carried out with three mobile phases (phosphate buffer pH 4.1, deionized water and methanol) at the total flow rate 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 40 μ L. Calibration was carried out based on the injection of 1, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng of each compound in the mixed standard solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

Reversed-phase liquid chromatography conditions were selected based on the following criteria: (1) mobile phase composition simple and compatible with ESI-MS; (2) relatively low pH favoring formation of proton-bound dimers in the ESI source;^[45] (3) separation of eleven compounds with chromatographic run comparable to those previously reported;^[29,35,43] (4) efficient column washing/re-equilibration. The detailed procedure is given in the Experimental section; using a gradient elution with ammonium formate 5 mmol L⁻¹ and acetonitrile containing formic acid 0.1% (v/v), separation was achieved in 12 min with no need for pH adjustment (pH 5.6). The total chromatographic run had to be longer (20 min) in order to avoid memory effects and ionization interferences, especially in the analysis of plant extracts. The retention time for each compound is given in Table 1, together with relative standard deviation (RSD) based on five non-successive injections. Using positive ESI mode, full scan mass spectra were obtained for each standard injected individually; the most abundant ion for cytosine-containing compounds corresponded to the respective proton-bound homo-dimer [2M+H]⁺ whereas for U, G, dG, T, A and dA mainly their protonated molecules were generated [M+H]⁺ (Supplementary Fig. 1S shows the mass spectra recorded for C, dC, 5mdC, 5hmdC and 5mC and the EIC for each dimer and for the protonated monomer; the dimer structures are presented in Supplementary Fig. 2S,^[45] see Supporting Information). Fragmentation applied in auto-MS² mode produced protonated monomers of cytosines [M+H]⁺, though for other compounds neutral loss of ribose [M+H-132]⁺ or deoxyribose [M+H-116]⁺, respectively, was observed. When the second fragmentation was applied for [M+H]⁺ cytosines, glycoside cleavage occurred. In further development, two quantification procedures based on MRM were considered; (1) determination of eleven compounds based on a single ion transition (MS²) and (2) determination of five cytosine-containing compounds based on two ion transitions (MS³).

Table 1. MRM parameters for cytosine-based compounds of interest (isolation width $m/z \pm 2$, fragmentation amplitude 0.5 V)

Analyte ^a	MM	t_{ret} (min) (RSD, %) ^b	Time ^c (min)	precursor ion, m/z	MS ² quantifier ion, m/z	MS ³ quantifier ion m/z
C	243.22	3.79 (1.0)	0–7.3	487	244	112
dC	227.22	4.35 (5.1)	0–7.3	455	228	112
5hmdC	257.24	4.54 (3.6)	0–7.3	515	258	142
U	244.20	4.87 (4.2)	0–7.3	245	113	-
5mC	257.24	5.27 (1.5)	0–7.3	515	258	126
5mdC	241.24	6.86 (5.3)	0–7.3	483	242	126
G	283.24	7.50 (2.9)	7.3–12	284	152	-
dG	267.24	8.21 (3.5)	7.3–12	268	152	-
T	242.23	9.25 (0.6)	7.3–12	243	127	-
A	267.24	9.62 (1.5)	7.3–12	268	136	-
dA	251.24	9.95 (1.0)	7.3–12	252	136	-

^aC: cytidine; dC: 2'-deoxycytidine; 5hmdC: 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine; U: uridine; 5mC: 5-methylcytidine; 5mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; g: guanosine; dG: deoxyguanosine; T: thymine; A: adenosine; dA: deoxyguanosine.

^bRSD calculated for five non-successive replicates.

^cAcquisition time.

The chromatographic run was divided into two segments as indicated in Table 1 and fine-tuning of MRM conditions was obtained by testing different fragmentation amplitudes (0.2–1.0 V, isolation width $m/z \pm 2$). Based on the criterion of as high as possible signal-to-noise ratio (S/N), 0.5 V was selected for all compounds in the first ion transition and also for cytosine-containing compounds in the second transition (Supplementary Fig. 3S, see Supporting Information) shows the effect of fragmentation amplitude on S/N for 11 compounds; for comparative purposes, negative and positive ESI polarization was used). In Table 1, precursor and quantifier ions are given for each compound under MS² and MS³ conditions (chromatograms of the 11 compounds in the standard mix are presented in Supplementary Fig. 4S, see Supporting Information). Calibration functions were obtained and typical analytical parameters were evaluated for each compound (Supplementary Fig. 5S (Supporting Information) shows HPLC/ESI-ITMS³ chromatograms of calibration solutions). Results for cytosine-containing nucleosides in MS² and MS³ mode are presented in Table 2 (Supplementary Table 1S (Supporting Information) summarizes the above parameters evaluated for other compounds in the MS² method). Noteworthy, the on-column detection limits for five compounds of interest were in the range 9–35 fmol using MS² conditions and 20–122 fmol using MS³; these values are higher as compared to 0.2–12.8 fmol range reported while using more powerful instrumentation (linear ion trap – quadrupole, orbitrap or triple quadrupole mass spectrometers);^[35,38,42,51] however, extremely high detection power is not critical in plant analysis because of the fairly large amount of biomass available and also due to relatively high percentages of DNA methylation as compared to animal genomes. On the other hand, conventional ion trap spectrometers are less expensive, less susceptible to variation in instrumental conditions, easy to operate and allow for several successive ion fragmentations. When more than one

ion transition are used for MRM, sensitivity loss is unavoidable but at the same time spectral background can be eliminated more efficiently with obvious benefits for accuracy and precision. Indeed, the detection limits obtained for MS³ were worse as compared to MS² but, at first glance, MS³ mode provided enhanced repeatability (compare RSD values for slope and between-day precision at the 1 ng level, Table 1).

Method performance in the analysis of plant extracts

To ensure extraction of DNA together with a representative portion of total RNA contained in the sample, the procedure reported by Aljanabi *et al.* was applied.^[29,48] Several chromatograms obtained in full scan mode for plants exposed to CuO NPs revealed the presence of copper bound to dimers of cytosine-containing compounds [2M+Cu]⁺. These adducts were observed in MS spectra despite the presence of EDTA in the extraction buffer and despite extensive washing of the nucleic acid pellet; however, when the pellet was additionally washed with ethanol containing bathocuproine disulfonic acid dissolved in ammonium formate mobile phase (pH 5.6), copper adducts were no longer detected. Typical full scan spectra acquired in the elution region of 5mDC for the same plant extract with and without bathocuproine sulfate treatment are presented in Fig. 1. The above data support several earlier studies reporting partial solubilization of CuO NPs in plants and partial reduction of Cu(II) to Cu(I).^[23,30] Possible formation of Cu(I) adducts with nucleosides is biologically relevant and calls for further investigation. Within the context of this work, metal adducts had to be eliminated in order to avoid analytical errors in the evaluation of methylation/hydroxymethylation of nucleic acids.

For accuracy testing, two samples were spiked with standard mix as described in the Experimental section (0.5 ng of each nucleoside) and analyzed by the proposed

Table 2. Linear regression functions evaluated for five cytosine-containing compounds, on-column detection limits (DL) and quantification limits (QL) evaluated for the MS² and MS³ modes of MRM

Analyte	Calibration function ^a	R	RSD slope ^b	LD ^c		LQ ^d		CV ^e
				ng	Fmol	Ng	fmol	
MRM based on one ion transition (MS²)								
C	$A = (1.493c - 0.055) \times 10^6$	0.9993	4.5	0.008	35	0.028	116	1.4
dC	$A = (3.904c - 0.069) \times 10^6$	0.9988	6.4	0.003	11	0.008	37	1.5
5hmdC	$A = (1.403c - 0.086) \times 10^6$	0.9992	5.8	0.010	41	0.035	135	1.5
5mC	$A = (2.351c - 0.226) \times 10^6$	0.9926	6.2	0.006	22	0.019	75	1.8
5mdC	$A = (4.370c - 0.184) \times 10^6$	0.9985	3.0	0.002	9	0.007	31	1.3
MRM based on two ion transitions (MS³)								
C	$A = (0.581c - 0.016) \times 10^6$	0.9997	6.0	0.030	122	0.099	407	1.1
dC	$A = (2.134c - 0.047) \times 10^6$	0.9953	2.9	0.005	23	0.018	77	0.4
5hmdC	$A = (1.079c - 0.057) \times 10^6$	0.9992	2.9	0.011	43	0.037	142	0.7
5mC	$A = (1.348c - 0.097) \times 10^6$	0.9929	4.4	0.011	42	0.036	139	1.0
5mdC	$A = (2.987c - 0.212) \times 10^6$	0.9994	2.6	0.005	20	0.016	67	0.4

^aA: peak area for the quantifier; c: concentration, $\mu\text{g mL}^{-1}$.

^bRSD evaluated for three independent calibration processes.

^cLD: detection limit evaluated based on S/N = 3.

^dQL: quantification limit evaluated based on S/N = 10.^[55]

^eCV: evaluated for five non-successive injections of calibration standard (1 ng on-column).

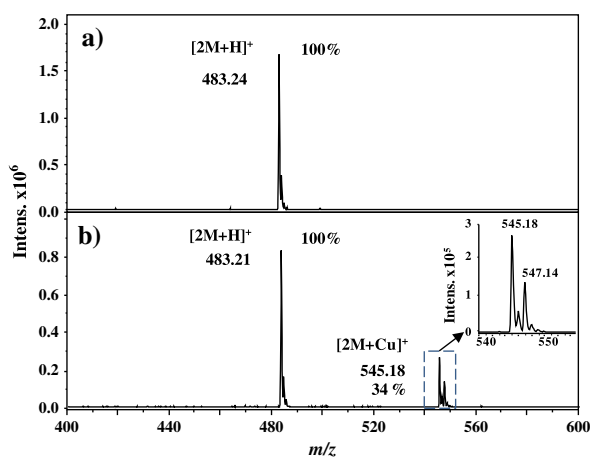


Figure 1. Full scan mass spectra acquired for 5mdC from DNA digests (*L. sativum* exposed to CuO NP 1000 mg L⁻¹, 6.79 to 6.92 min): (a) washing of nucleic acids pellet with bathocuproine disulfate and (b) without washing.

procedure using MRM in MS² and MS³ mode; the respective chromatograms are presented in Fig. 2. For MS², the percentage recoveries for 11 compounds were in the range 80–118% and, for five cytosine-containing compounds in MS³, the range was 88–110% (detailed quantification results are presented in Supplementary Table 2S, Supporting Information). It should be stressed that 5hmdC was not detected in any sample; therefore, hydroxymethylation of DNA was not considered in further development.

Global DNA and RNA methylation were evaluated as the molar ratio 5mdC/(5mdC+dC)·100 and 5mC/(5mC+C)·100, respectively. In the first approach, salmon sperm DNA (Sigma) was analyzed as a reference sample yielding global methylation 6.89 ± 0.05% under MS³ conditions (6.89 ± 0.06% for MS²), consistent with the results obtained previously using different analytical procedures.^[52,53]

In order to evaluate possible matrix effects in the analysis of plant material, serially diluted samples were analyzed using for this purpose the hydrolyzate of the *L. sativum* exposed to CuO NPs (250 mg L⁻¹) and hydrolyzate of the salmon sperm DNA as a reference. In both cases 200, 150, 100, 75, 50, 25 and 10 ng DNA were injected into the chromatographic system. For salmon DNA (Sigma product), preparation of the above solutions was straightforward, but for plant extracts composed of RNA and DNA an estimation had to be made. The relative distribution of DNA and RNA introduced on-column was found to be approximately 1:10, based on the ratio of (C+5mC)/(dC+5mdC) signal intensities;^[29] accordingly, a 2-μL sample aliquot adjusted to 200 ng DNA contained about 2 μg RNA. It should be stressed, however, that the above estimation did not consider the different sensitivities obtained for individual compounds, nor the presence of several modifications of ribonucleosides detected in the exposed plants (data not included here). On the other hand, the precise DNA/RNA mass was not required, because global methylation refers to the relative amount of methylated cytosines with respect to total cytosine groups present in any portion of the sample. Chromatograms obtained for salmon sperm DNA using MS² and MS³ conditions are presented in Figs. 3(a) and 3(b), respectively (left panel). The right panels in Figs. 3(a) and 3(b) show the

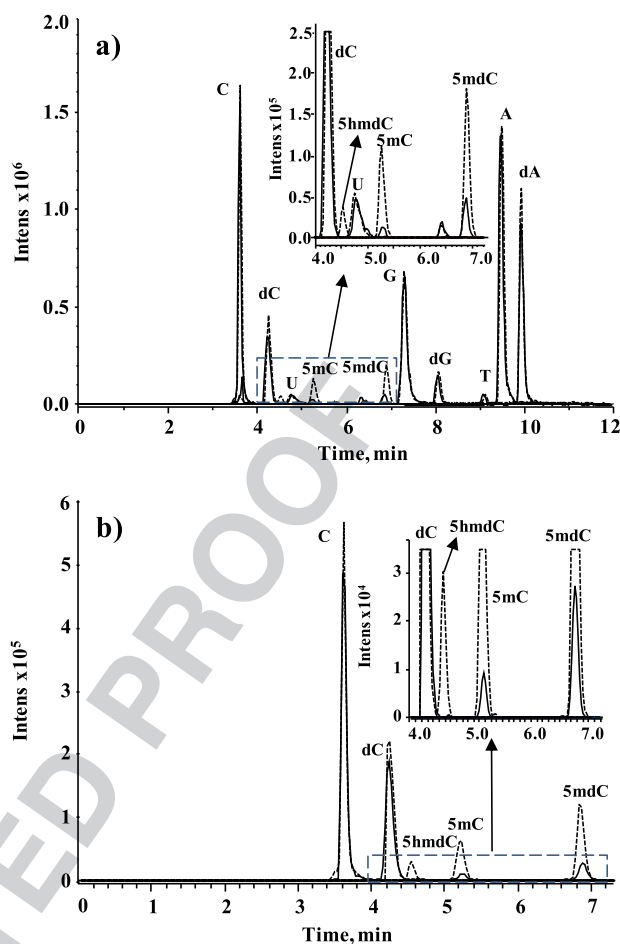


Figure 2. Chromatograms obtained for nucleic acid hydrolyzates of plants exposed to CuO NPs and these same samples after standard addition (0.5 ng of each compound on-column, the detailed description given in Experimental). (a) *L. sativum* grown in the presence of CuO NPs 1000 mg L⁻¹; MS² conditions (C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136). (b) *L. sativum* grown in the presence of CuO NPs 50 mg L⁻¹; MS³ conditions (C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126).

analytical signals of 5mdC (peak area, solid line) and global DNA methylation (dashed line) as obtained for each DNA mass injected (standard deviations based on three replicates). The trend line computed for 5mdC in function of DNA mass presented slightly better linearity ($r=0.999$) for MS³ with respect to MS² conditions ($r=0.993$) but, in both cases, no important deviation from linearity was observed within the whole range of DNA mass injected. Furthermore, the percentages of DNA methylation evaluated in this experiment were practically unaffected by sample dilution (Fig. 3) indicating interference-free conditions. Of note, MS² yielded poorer precision as compared to MS³, especially for low DNA masses (note RSD values for 10–50 ng DNA, Fig. 3), which points to more efficient background elimination under MS³ conditions.

Figure 4 presents the HPLC/ESI-ITMS³ chromatograms corresponding to different DNA masses from plant material together with the trend lines for 5mdC and 5mC signals and

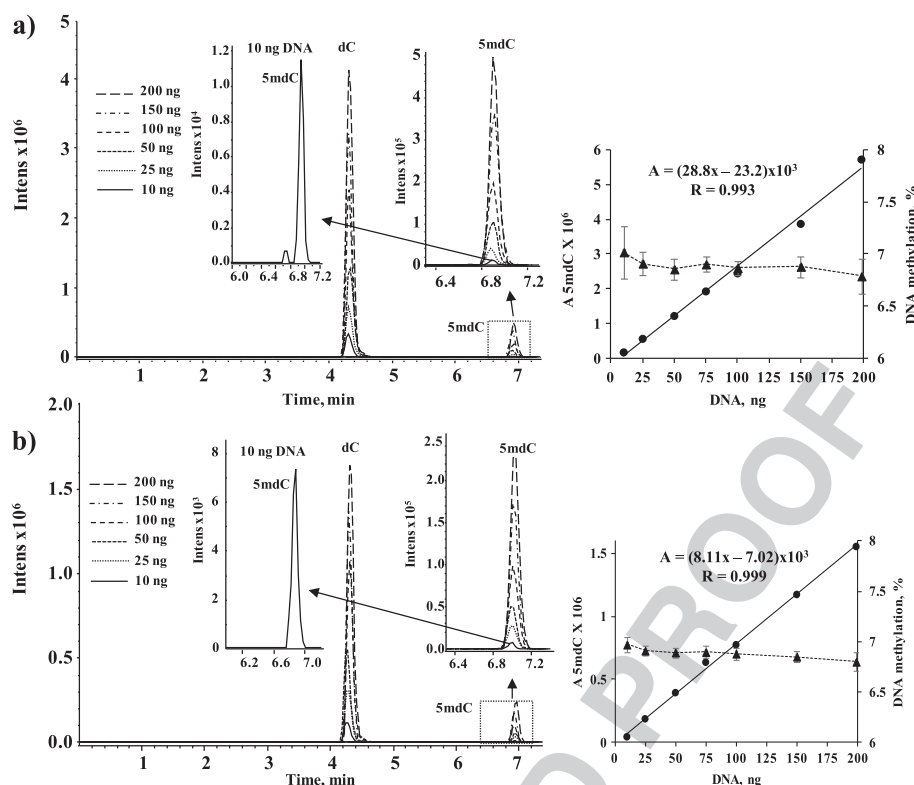


Figure 3. Left panel: HPLC/ESI-ITMS chromatograms obtained for different amounts of salmon sperm DNA. Right panel: effect of DNA mass on the 5mdC signal (peak area, solid line) and percentage of DNA methylation (dashed line). (SD based on three replicates). (a) MRM under MS^2 conditions (483/242) and (b) MRM in MS^3 conditions (483/242/126).

the evaluated percentages of DNA/RNA methylation. Although the amount of sample loaded into the system was much higher than for salmon DNA ($2.2 \mu\text{g}$ DNA+RNA against $0.2 \mu\text{g}$ DNA in the most concentrated samples), the trend lines for two methylated cytidines presented excellent linearity in the whole mass range studied ($r > 0.999$). Taking all dilutions tested, mean values obtained for DNA and RNA methylation were $11.03 \pm 0.04\%$ and $1.02 \pm 0.05\%$, respectively. As observed in Fig. 4, DNA mass in the range 50–100 ng ($0.5\text{--}1 \mu\text{g}$ RNA) seems to be the most appropriate for the analysis due to practically identical methylation percentages and lower standard deviations obtained as compared to other sample dilutions tested. Noteworthy, the slope of the 5mdC trend line evaluated for plant analysis by MS^3 was $18.6 \cdot 10^3$ (Fig. 4) whereas for salmon DNA it was $8.1 \cdot 10^3$ (Fig. 3); since plant DNA contains about 1.6 times more 5mdC than salmon DNA (11.03% and 6.89% , respectively), the roughly evaluated ratio between trend lines relating signal 5mdC to on-column nanograms of 5mdC in DNA from two different samples would be 1.44. As already described, the exact amounts of DNA and RNA in the plant extract remain unknown so the above reasoning is imprecise although it confirms that the huge excess of RNA in plant sample had a marginal effect on 5mdC ionization (similar results were obtained for other cytosine-based compounds).

Finally, HPLC/ESI-ITMS² results for the serially diluted nucleic acid hydrolyzate of *L. sativum* are presented in Fig. 5. Despite the higher intensity of the chromatographic peaks, the linearity of the trend lines for 5mdC ($r = 0.994$) and 5mC

($r = 0.997$) was slightly worse as compared to MS^3 conditions. Most importantly, the percentages of methylation evaluated for DNA ($11.00 \pm 0.10\%$, taking all data) and RNA ($1.12 \pm 0.09\%$) were more affected by the amount of sample injected and the results for each sample mass were less precise with respect to MS^3 (Figs. 4 and 5). The estimation described above to compare slopes between lines relating signal 5mdC to its mass loaded on-column ($31.2 \cdot 10^3$, Fig. 5) to salmon DNA ($8.1 \cdot 10^3$, Fig. 3) yielded the ratio 2.40 which clearly indicates more pronounced matrix effects while using one ion transition for MRM against two ion transitions. Nevertheless, the sample amount corresponding to 50–100 ng of DNA in a $2\text{-}\mu\text{L}$ injection seems to be appropriate for MS^2 analysis; the evaluated percentages of methylation for DNA and RNA in this range were $11.05 \pm 0.03\%$ and $1.12 \pm 0.01\%$, respectively. Based on the results presented in this section, about 50 ng of DNA were introduced on-column in the analysis of plant extracts.

Analysis of plant extracts

L. sativum was grown under exposure to CuO NPs as described in the Experimental section and, after harvesting, the lengths of roots and aerial parts were measured for 50 seedlings per culture. The presence of NPs in the medium had no significant effect on the aerial parts, whereas root growth was clearly inhibited even at relatively low concentration 10 mg L^{-1} CuO (the detailed results are presented in Supplementary Fig. 6S, Supporting Information). Chlorophyll measured for several randomly selected leaf

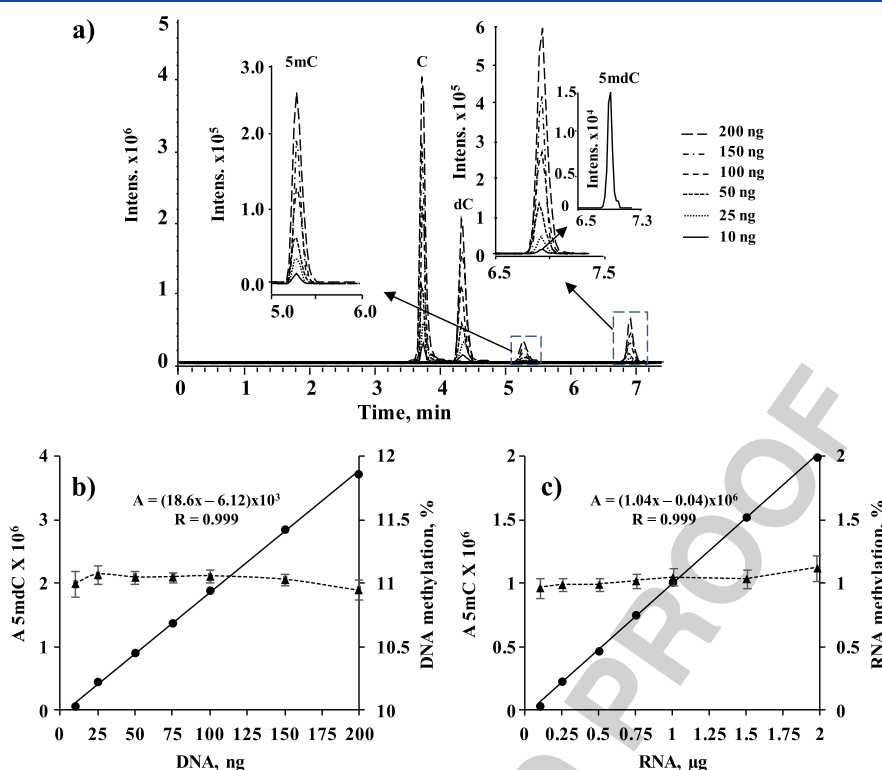


Figure 4. Effect of DNA mass injected into the HPLC/ESI-ITMS³ system for *L. sativum* exposed to CuO NPs 250 mg L⁻¹ (SD based on three replicates): (a) MRM chromatograms: C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mCdC 483/242/126; (b) 5mCdC signal (peak area, solid line) plotted against DNA mass injected and the evaluated percentages of DNA methylation (dashed line); (c) 5mC signal (peak area, solid line) plotted against RNA mass injected and evaluated percentages of RNA methylation (dashed line)

(SPAD-502) was practically not affected even at the highest concentration of NPs; the mean SPAD value for control seedlings was 34.20 ± 0.53 and for the highest concentration of NPs (1000 mg L⁻¹ CuO) it was 31.05 ± 0.53 (photos of *L. sativum* cultures and SPAD results are given in Supplementary Fig. 7S, Supporting Information). For each exposure condition, total copper was determined in the freeze-dried biomass of *L. sativum* and in the centrifuged spent medium (12 000 g, 15 min). Of note, a dark pellet was clearly observed in the centrifuged samples, especially for higher concentrations of CuO NPs added to the Hoagland solution; the concentration found in the centrifuged medium was considered indicative of solubilized copper. The results presented in Table 3 demonstrate that *L. sativum* absorbed a relatively low percentage of element added in the form of CuO NPs (1.0–20.2%) although for the increasing concentration of NPs in medium, the amount of copper in the biomass gradually augmented. Furthermore, the effect of plant exudates on the solubilization of NPs in the growth medium was marginal, in agreement with other studies.^[23,30]

Our data suggest that copper was incorporated into plants in the form of NPs, also consistent with earlier reports.^[2,30] Detection of a Cu adduct with cytosine dimers and their elimination from mass spectra by washing the extract with a Cu(I)-complexing agent indicate that CuO NPs were at least partially solubilized *in vivo* and probably reduced to Cu(I).

Once demonstrated that depending on the exposure conditions, the analyzed biomass contained different concentrations of total Cu (probably as partially solubilized NPs), HPLC/ESI-ITMS² and the MS³ procedure and HPLC-DAD method^[36] were used to determine global methylation of nucleic acids extracted from each plant culture. As already mentioned, 5hmdC was not detected in any of the samples. For control plants, global DNA methylation determined was $13.03 \pm 0.21\%$ using MS³ conditions, $13.23 \pm 0.35\%$ for MS² and $12.92\% \pm 0.32\%$ based on HPLC-DAD analysis; the agreement between these values is indicative of good accuracy. Global DNA methylation results for all plant cultures are presented in Fig. 6(a) and it can be observed that the three procedures yielded very similar results. Of note, MRM quantification in MS² and MS³ mode provided similar precision, in accord to the results presented in Figs. 4 and 5 for injection of DNA mass 50–100 ng. In the presence of 5 and 10 mg L⁻¹ of CuO NPs, an increase in global methylation was detected, which might be ascribed to the activation of a defensive response in the plant;^[54] however, for a higher concentration of CuO in the medium, a tendency of hypomethylation becomes clear. Hypomethylation has often been described in plants under abiotic stress,^[29,54] yet data for metal-containing nanoparticles are scarce.^[10] A discussion of the possible biological relevance of the observed effect is beyond the scope of our work; on the

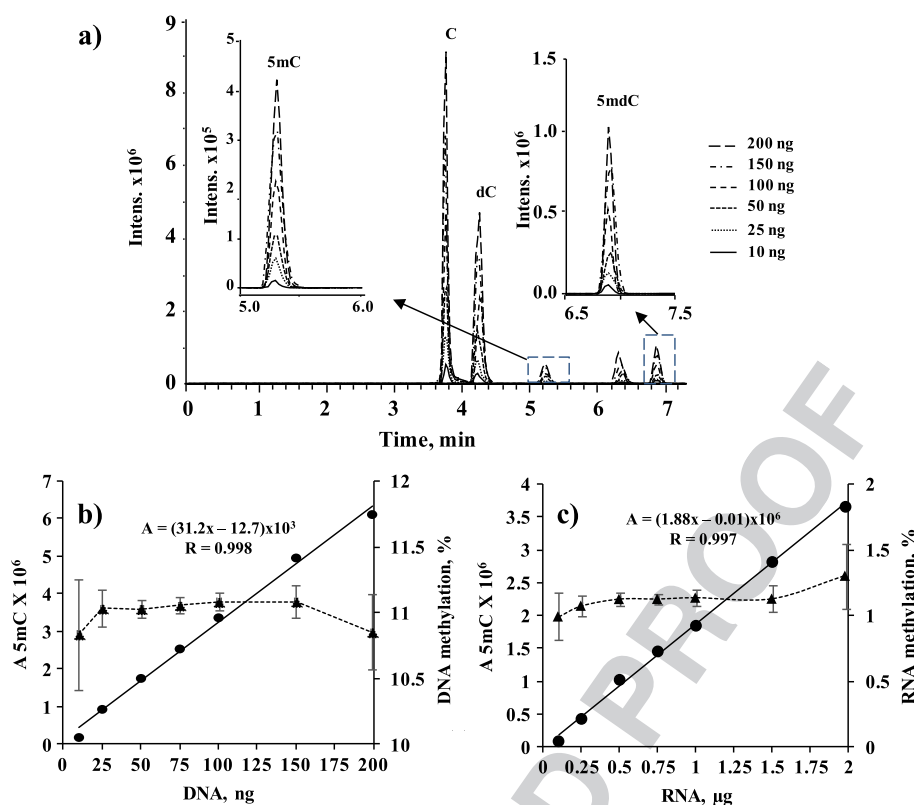


Figure 5. Effect of DNA mass injected into the HPLC/ESI-ITMS² system for *L. sativum* exposed to CuO NPs 250 mg L⁻¹. (a) MRM chromatograms: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, 5mC 515/258, 5mdC 483/242; (b) 5mdC signal (peak area, solid line) plotted against DNA mass injected and the evaluated percentages of DNA methylation (dashed line); and (c) 5mC signal (peak area) plotted against RNA mass injected and evaluated percentages of RNA methylation.

Table 3. Distribution of copper in hydroponic cultures of *Lepidium sativum* determined for different concentrations of CuO NPs added to the Hoagland solution

Cu added to medium		Cu determined in biomass ^a		Cu in spent medium		
CuO NPs (mg L ⁻¹)	Total Cu ^b (mg)	Mean ± SD (µgCu g ⁻¹)	Total Cu ^c (µg)	Mean ± SD (µgCu L ⁻¹)	Total Cu ^b (µg)	Residual Cu ^d as CuNPs (%)
0	0	30.4 ± 3.4	19.7	0.03 ± 0.02	0.003	-
10	0.80	248 ± 24	161	0.13 ± 0.01	0.013	79.8
50	3.99	832 ± 2	541	0.18 ± 0.01	0.018	86.5
250	20.0	1034 ± 4	672	0.32 ± 0.01	0.032	96.6
1000	79.9	1227 ± 133	797	0.73 ± 0.01	0.073	99.0

^aFreeze-dried biomass.

^b100 mL of the Hoagland solution.

^cFreeze-dried biomass per culture about 650 mg.

^dCalculated as: [(mg Cu added) - (mg Cu in biomass) - (mg Cu in spent medium)]/(mg Cu added).

other hand, the proposed HPLC/ESI-ITMS³ or MS² procedure has proved its utility for the evaluation of changes in DNA methylation in response to metal-containing NPs.

Results obtained for RNA by using MS and DAD detection were also soundly coherent; for unexposed plants, methylation percentage was 0.91 ± 0.02% for MS³, 0.92 ± 0.04% for MS² and

0.94 ± 0.06% for DAD, similarly as reported previously using a different analytical procedure.^[29] As shown in Fig. 6(b), exposure to CuO NPs had no clear effect for RNA methylation. Within the context of an actual discussion on the possible role that 5mC may have in epigenetic machinery,^[26,27,29] our results seem to contradict the hypothesis, at least as referred to plants exposed to CuO NPs as stressing agent. From the analytical

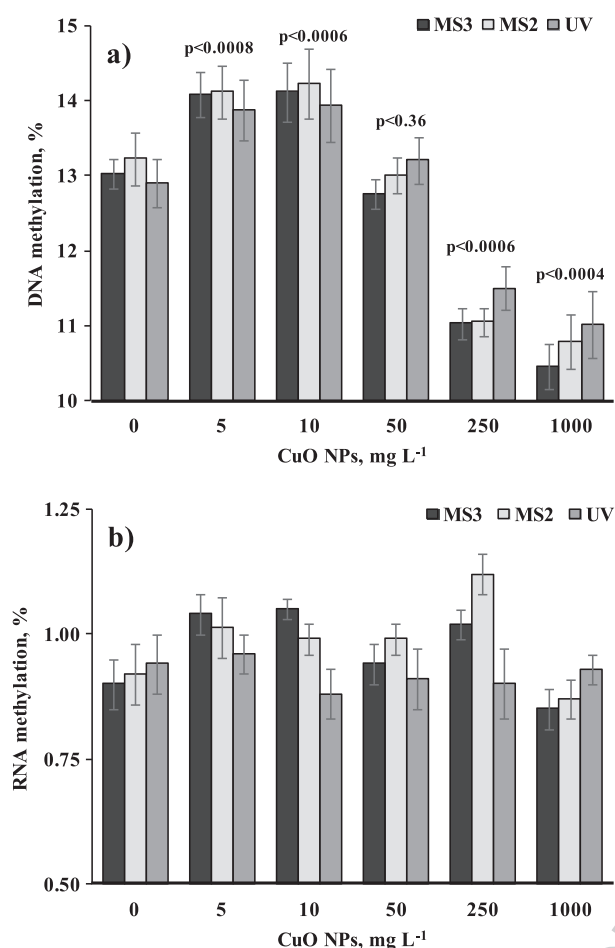


Figure 6. Effect of CuO NPs on the global methylation of nucleic acids in *Lepidium sativum*: (a) global DNA methylation and (b) methylation of total RNA.

point of view, the procedure proposed in this work can be safely used for the evaluation of methylation percentage in total RNA at <1% level.

CONCLUSIONS

A relatively simple procedure has been established for the determination of 11 nucleosides (C, dC, 5hmdC, U, 5mC, 5mdC, G, dG, T, A, dA) in nucleic acid extracts of plants, using reversed-phase chromatographic separation coupled via ESI(+) to a conventional ion trap mass spectrometer with MRM quantification. It was demonstrated that proton-bound cytosine homo-dimers formed in the ESI(+) source can be used for quantitative purposes; application of two ion transitions yielded enhanced selectivity toward five cytosine-containing compounds (C, dC, 5hmdC, 5mC, 5mdC) which is of special interest for the evaluation of global methylation or hydroxymethylation of DNA and methylation of RNA. Even though worse detection/quantification limits were obtained for MS³ as compared to MS² conditions, two ion transitions enabled for more efficient elimination of interferences and made the procedure less susceptible to variation in the sample mass introduced into the system. This latter aspect is important because in the analysis of complex

biological samples, the on-column amount of nucleic acids is difficult to control and in fact not required for the evaluation of global methylation (percentage of methylated cytosines remains constant in any portion of the sample). In the application of the proposed procedure for the analysis of plants exposed to CuO NPs, copper adducts with cytosine dimers were detected in full scan mass spectra. Additional washing of nucleic acids with bathocuproine disulfonic acid allowed for elimination of Cu-containing species, which indicates that CuO NPs were at least partially solubilized *in vivo* with formation of Cu(I). Elimination of adducts was necessary to avoid quantification errors.

The growth of aerial parts and chlorophyll content in *L. sativum* was not affected by exposure to CuO NPs (up to 1000 mg L⁻¹), although roots growth was inhibited. It was demonstrated that absorption of NPs by plants was relatively low (1.0–20.2% of total Cu added to medium) and occurred in a CuO concentration-dependent manner. For concentration of NPs higher than 50 mg L⁻¹, global DNA methylation decreased with respect to unexposed plants, as often reported for plants under abiotic stress. Methylation of total RNA was also evaluated yet this parameter was not affected by plant exposure; in apparent disagreement with other reports of the possible participation of this RNA modification in epigenetic events. Within the context of controversial reports on cytosine hydroxymethylation in plants, in this work 5hmC was not detected in any of the samples.

Acknowledgements

Financial support from the National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), Projects 178553, 260373 is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] J. Mytych, M. Wnuk. Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2013**, *4*, 53.
- [2] J. R. Peralta-Videa, L. Zhao, M. L. Lopez-Moreno, G. De la Rosa, J. Hong, J. L. Gardea-Torresdey. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *186*, 1.
- [3] S. Chibber, S. A. Ansari, R. Satar. New vision to CuO, ZnO and TiO₂ nanoparticles: their outcome and effects. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 1492.
- [4] S. Shyamasundar, C. T. Ng, L. Y. L. Yung, S. T. Dheem, B. H. Bay. Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity. *Epigenomics* **2015**, *7*, 395.
- [5] M. Ruffini Gastiglione, R. Cremonini. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* **2009**, *62*, 161.
- [6] A. K. Shaw, Z. Hossain. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* **2013**, *93*, 906.
- [7] E. Fröhlich. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14*, 976.
- [8] A. Stoccoro, H. L. Karlsson, F. Coppedè, L. Migliore. Epigenetic effects of nano-sized materials. *Toxicology* **2013**, *313*, 3.
- [9] N. Singh, B. Manshian, G. J. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. Maffei, C. J. Wright, S. H. Doak. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3891.

- [10] X. Lu, I. R. Miousse, S. V. Pirela, S. Melnyk, I. Koturbash, P. Demokritou. Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome. *Nanotoxicology* **2015**. DOI:10.3109/17435390.2015.1025115.
- [11] A. Van der Graaf, R. Wardenaar, D. A. Neumann, A. Taudt, R. G. Shaw, R. C. Jansen, R. J. Schmitz, M. Colome-Tatche, F. Johannes. Rate, spectrum, and evolutionary dynamics of spontaneous epimutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**. DOI:10.1073/pnas.142454112.
- [12] C. E. Niederhuth, R. J. Schmitz. Covering your bases: inheritance of DNA methylation in plant genomes. *Mol. Plant.* **2014**, *7*, 472.
- [13] M. Ghosh, S. Bhadra, A. Adegoke, M. Bandyopadhyay, A. Mukherjee. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. *Mutat. Res.* **2015**, *774*, 49.
- [14] D. H. Atha, H. Wang, E. J. Petersen, D. Cleveland, R. D. Holbrook, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, B. Xing, B. C. Nelson. Copper oxide nanoparticles mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1819.
- [15] R. M. Kohli, L. Zhang. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **2013**, *502*, 472.
- [16] N. Chia, L. Wang, X. Lu, M. C. Senut, C. Brenner, D. M. Ruden. Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics* **2011**, *6*, 853.
- [17] M. R. Branco, G. Ficz, W. Reik. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 7.
- [18] M. Tellez-Plaza, W. Y. Tang, Y. Shang, J. G. Umans, K. A. Francesconi, W. Goessler, L. M., M. Leon, M. Laclaustra, J. Pollak, E. Guallar, S. A. Cole, M. D. Fallin, A. Navas-Acien. Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122*, 946.
- [19] J. K. Zhu. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 143.
- [20] H. Jang, H. Shin, B. F. Eichman, J. H. Huh. Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 1067.
- [21] Q. Yao, C. X. Song, C. He, D. Kumaran, J. J. Dunn. Heterologous expression and purification of *Arabidopsis thaliana* V1M1 protein: in vitro evidence for its inability to recognize hydroxymethylcytosine, a rare base in *Arabidopsis* DNA. *Protein Expr. Purif.* **2012**, *83*, 104.
- [22] A. Ivask, K. Juqanson, O. Bondarenko, M. Mortimer, V. Aruoja, K. Kasemets, I. Blinova, M. Heinlaan, V. I. Slaveykova, A. Kahru. Mechanism of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: a comparative review. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 57.
- [23] C. O. Dimkpa, J. E. McLean, D. E. Latta, E. Manangon, D. W. Britt, W. P. Johnson, M. I. Boyanov, A. J. Anderson. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 1125.
- [24] S. E. Castel, R. A. Martienssen. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 100.
- [25] W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. Vendeix, D. Fabris, P. F. Agris. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D195.
- [26] Y. Motorin, F. Lyko, M. Helm. 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1415.
- [27] J. E. Squires, R. P. Hardip, M. Nousch, T. Sibbritt, D. T. Humphreys, B. J. Parker, C. M. Suter, T. Preiss. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5023.
- [28] J. S. Mattick, P. P. Amaral, M. E. Dinger, T. R. Mercer, M. F. Mehler. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays* **2009**, *31*, 51.
- [29] E. Yanez Barrientos, K. Wrobel, A. Lopez Torres, F. Gutierrez Corona, K. Wrobel. Application of reversed phase high performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV). *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2397.
- [30] C. Peng, D. Duan, C. J. Xu, Y. Chen, L. Sun, H. Zhang, X. Yuan, L. Zheng, Y. Yang, J. Yang, X. Zhen, Y. Chen, J. Shi. Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environ. Pollut.* **2015**, *197*, 99.
- [31] J. Shi, C. Peng, Y. Yang, J. Yang, H. Zhang, X. Yuan, Y. Chen, T. Hu. Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 179.
- [32] Y. N. Chang, M. Zhang, L. Xia, J. Zhang, G. Xing. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* **2012**, *5*, 2850.
- [33] T. Dhingra, K. Mittal, G. S. Sarma. Analytical techniques for DNA methylation-an overview. *Curr. Pharm. Anal.* **2014**, *10*, 71.
- [34] J. Liu, L. B. Hesson, R. L. Ward. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the measurement of global DNA methylation and hydroxymethylation. *J. Proteomics Bioinform.* **2013**, S2-005. DOI:10.4172/jpb.S4172-4005.
- [35] L. Song, R. Smitha, J. L. Kazim, A. R. Karpf. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 504.
- [36] A. Alcazar Magana, K. Wrobel, Y. Alvarado Caudillo, S. Zaina, G. Lund, K. Wrobel. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 378.
- [37] S. Kouidou, L. Kovatsi, A. Iannou. Seeking the 5th base of DNA using chromatographic methods of analysis. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2268.
- [38] I. Yang, M. C. Fortin, J. R. Richardson, B. Buckley. Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 138.
- [39] W. Rozhon, T. Baubec, J. Mayerhofer, O. Mittelsten Scheid, C. Jonak. Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 354.
- [40] J. J. Zhang, L. Zhang, K. Zhou, X. Ye, C. Liu, L. Zhang, J. Kang, C. Cai. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 164.
- [41] X. Wang, Y. Suo, R. Yin, H. Shen, H. Wang. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1647.
- [42] X. Li, A. A. Franke. High-throughput and cost-effective global DNA methylation assay by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 58.
- [43] C. G. Zamboni, F. Palmisano. Electrospray ionization mass spectrometry of 5-methyl-2'-deoxycytidine and its determination in urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 2160.

- [44] S. Y. Han, H. B. Oh. Theoretical study of the ionic hydrogen bond in the isolated proton-bound dimer of cytosine. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *432*, 269.
- [45] D. Armentano, G. De Munno, L. Di Donna. Self-assembling of cytosine nucleoside into triply-bound dimers in acid media. A comprehensive evaluation of proton-bound pyrimidine nucleosides by electrospray tandem mass spectrometry, X-rays diffractometry, and theoretical calculations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 268.
- [46] J. C. Torres Elguera, E. Yanez Barrientos, K. Wrobel, K. Wrobel. Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 431.
- [47] A. Gomez Ojeda, A. R. Corrales Escobosa, K. Wrobel, E. Yanez Barrientos, K. Wrobel. Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in *Lepidium sativum*. *Metallomics* **2013**, *5*, 1254.
- [48] S. M. Aljanabi, I. Martinez. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4692.
- [49] S. E. Mitra. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **2003**.
- [50] F. Rossella, E. Polledri, V. Bollati, A. Baccarelli, S. Fustinoni. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2637.
- [51] T. Le, K. P. Kim, G. Fan, K. F. Fau. A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Anal. Biochem.* **2011**, *412*, 203.
- [52] A. Lopez Torres, E. Yanez Barrientos, K. Wrobel, K. Wrobel. Selective derivatization of cytosine- and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for sub-microgram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7999.
- [53] K. Wrobel, J. A. Landero Figueroa, S. Zaina, G. Lund, K. Wrobel. Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation – A novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 609.
- [54] R. Aina, S. Sgorbati, A. Santagostino, M. Labra, A. Ghiani, S. Citterio. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol. Plant.* **2004**, *121*, 472.
- [55] ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1), ICH, **2012**. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Application of liquid chromatography – electrospray ionization – ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles.

Armando Alcazar Magana, Kazimierz Wrobel, Alma Rosa Corrales Escobosa, Katarzyna Wrobel*

Chemistry Department, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico

Fig. 1S. Full scan MS spectra acquired for the individual cytosine-containing compounds injected to HPLC-ESI(+)-ITMS system (20 ng each) and the extracted ion chromatograms for each compound acquired for proton-bound dimer $(2M+H)^+$ and for protonated monomer $(M+H)^+$.

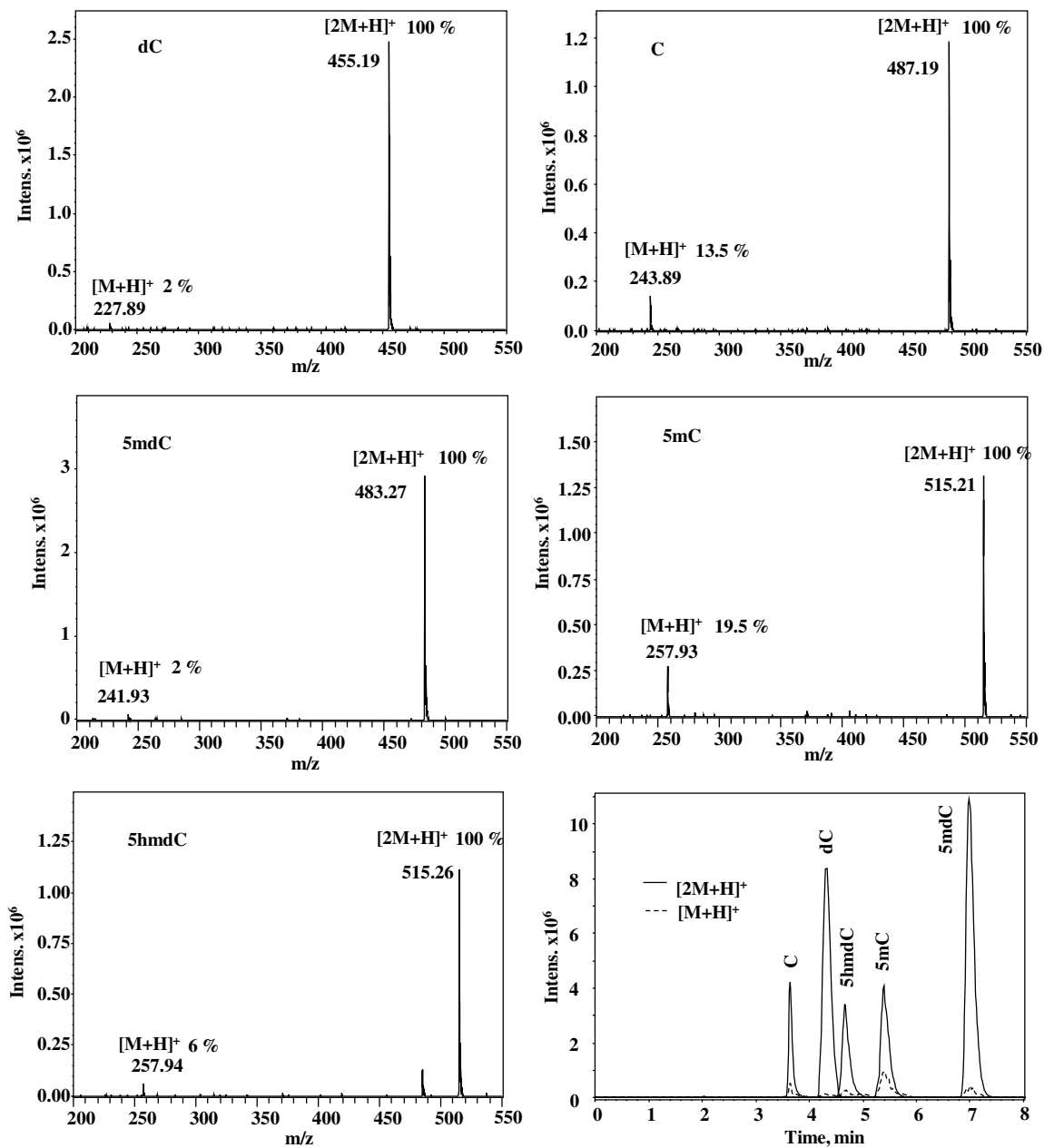


Fig. 2S. Structures of proton-bound homo-dimers of cytosine-containing compounds.

General structure ¹	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄	<i>m/z</i> (2M+H ⁺)	Dimer
	ribose	H	H	487	C
	deoxyribose	H	H	455	dC
	deoxyribose	CH ₃ OH	CH ₃ OH	515	5hmdC
	ribose	CH ₃	CH ₃	515	5mC
	deoxyribose	CH ₃	CH ₃	483	5mdC

¹ – adopted from *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15, 268-279

It should be stressed that hetero-dimeras are not observed because chromatographic separation was carried out prior to ESI-MS

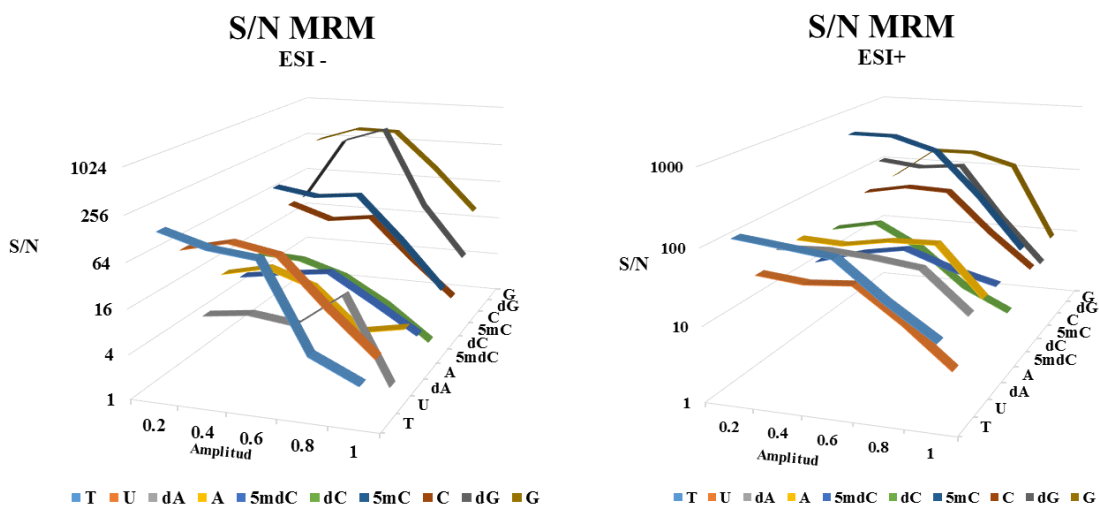
Fig. 3S. Effect of fragmentation amplitude on S/N ratio of 11 compounds obtained while using negative and positive aESI polarization (10 ng of each compound).

Fig. 4S. Typical chromatograms obtained for the standard solution containing 11 compounds (1 ng of each on-column).

(a) MRM based on two ion transitions: C 487/244/112, dC 455/228/112, 5hmdC 515/258/142, 5mC 515/258/126, 5mdC 483/242/126.

(b) MRM based on one ion transition: C 487/244, dC 455/228, 5hmdC 515/258, U 245/113, 5mC 515/258, 5mdC 483/242, G 284/152, dG 268/152, T 243/127, A 268/136, dA 252/136.

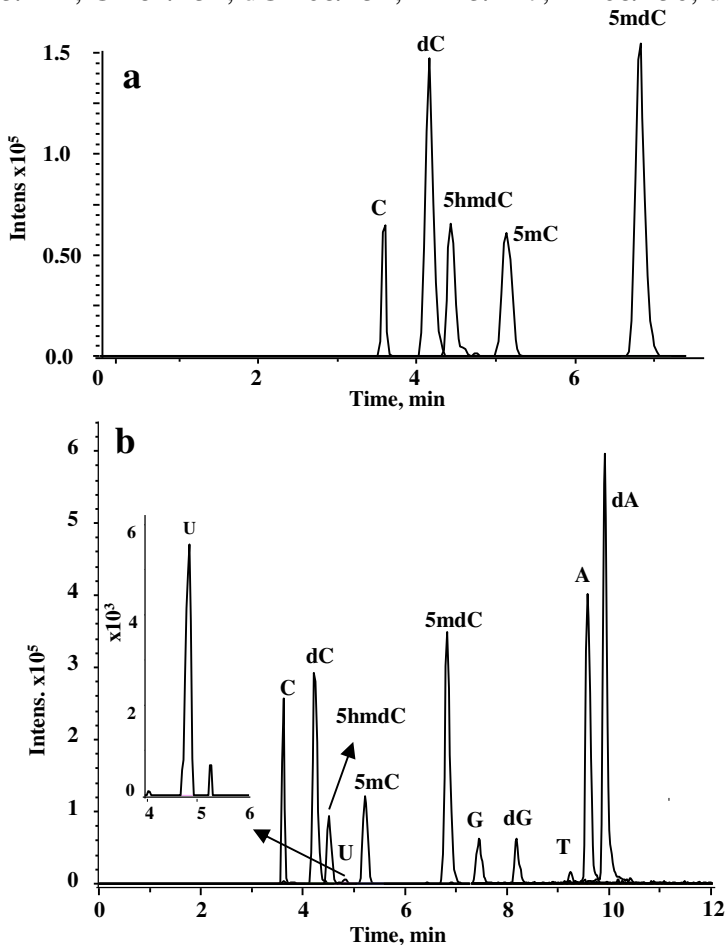


Fig. 4S. HPLC-ESI-ITMS chromatograms obtained for calibration solutions in MS³ mode.

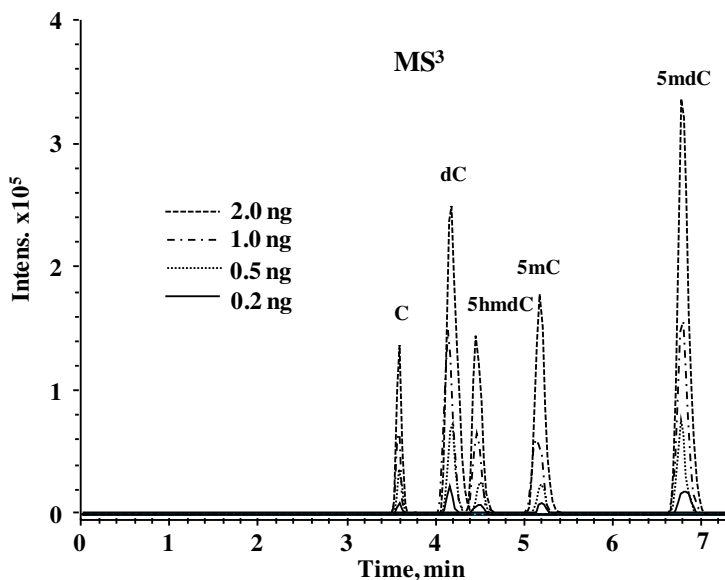


Table 1S. Linear regression functions evaluated for Uridine (U), guanosine (G), deoxyguanosine (dG), thymine (T), adenine (A) and deoxyadenine (dA), on-column detection limits (DL) and quantification limits (QL) evaluated for MS² mode of MRM

Analyte	Calibration function ¹	R	RSD	LD ³		LQ ⁴		CV ⁵
			slope ²	ng	fmol	ng	fmol	%
U	A=(0.081c+0.001)10 ⁶	0.9996	4.55	0.041	168	0.137	560	2.3
G	A=(0.799c+0.028)10 ⁶	0.9932	7.31	0.011	40	0.011	135	1.6
dG	A=(0.690c+0.011)10 ⁶	0.9974	5.00	0.010	38	0.010	128	1.9
T	A=(0.142c+0.007)10 ⁶	0.9989	0.35	0.041	170	0.041	567	2.7
A	A=(3.807c+0.298)10 ⁶	0.9846	1.29	0.002	8	0.002	28	1.3
dA	A=(7.226c+0.213)10 ⁶	0.9923	3.07	0.002	7	0.002	24	0.9

¹ A - peak area for the quantifier; c - concentration, µg mL⁻¹

² RSD evaluated for three independent calibration processes

³ LD - detection limit evaluated based on the S/N = 3

⁴ QL - quantification limit evaluated based on the S/N = 10 [54]

⁵ CV - evaluated for five non-successive injections of calibration standard (1 ng on-column)

Table 2S. Results obtained for the method of standard addition (0.5 ng on-column of each compound) using MS² and MS³ conditions. Respective chromatograms are presented in Figure 6S

Analyte	MS ²			MS ³		
	Mean ± SD, ng per 2 µL injection		Recovery %	Mean ± SD, ng per 2 µL injection		Recovery %
	Sample	Sample + 0.5 ng STD		Sample	Sample + 0.5 ng STD	
C	20.7±1.1	21.1±1.2	100	20.7±1.2	21.2±0.8	100
dC	2.50±0.12	2.98±0.14	96	2.60±0.09	3.07±0.12	94
5hmdC	<DL	0.47±0.06	94	<DL	0.46±0.05	92
U	14.6±0.09	15.0±1.1	80	-	-	-
5mC	0.20±0.03	0.78±0.08	116	0.21±0.02	0.74±0.08	106
5mdC	0.31±0.04	0.82±0.09	102	0.32±0.02	0.81±0.05	98
G	32.7±1.7	33.1±1.5	80	-	-	-
dG	2.96±1.4	3.38±1.2	84	-	-	-
T	2.98±1.3	3.56±0.7	116	-	-	-
A	15.6±1.2	16.1±2.3	100	-	-	-
dA	3.12±0.14	3.71±0.19	118	-	-	-

Fig. 5S. Effect of the concentration of CuO NPs added to the growth medium on the length of roots and aerial parts of *L.sativum*.

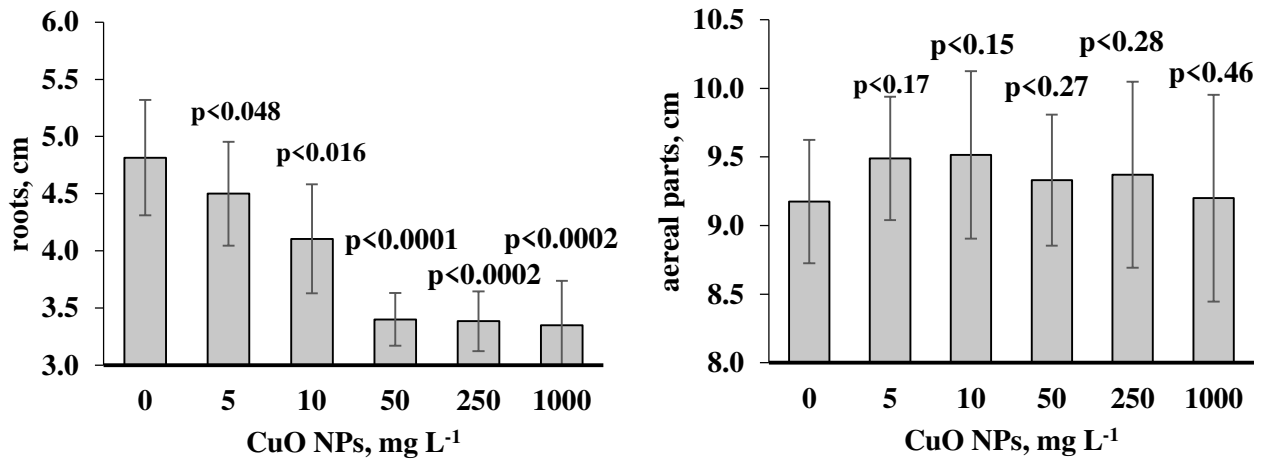
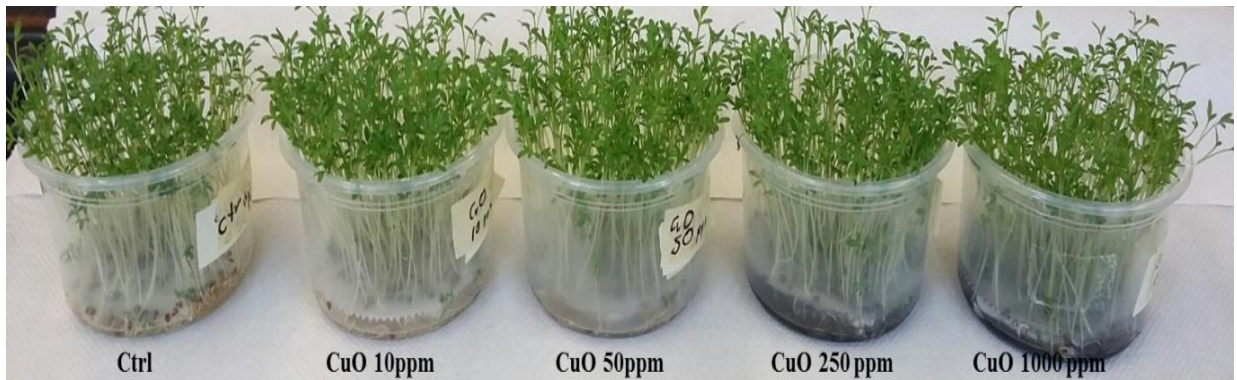


Fig. 6S. Photos of *L. sativum* cultures obtained under different exposure conditions and SPAD results for chlorophyll (SPAD units \pm SD, 15 leaves).



34.20 \pm 0.53	33.78 \pm 0.44	32.15 \pm 0.45	32.02 \pm 0.52	31.05 \pm 0.56
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

← SPAD values

RESEARCH ARTICLE

Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus

Geovanny I. Nic-Can¹*, Rosa M. Galaz-Ávalos¹, Clelia De-la-Peña², Armando Alcazar-Magaña³, Kazimierz Wrobel³, Víctor M. Loyola-Vargas¹*

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México, **2** Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México, **3** Department of Chemistry, University of Guanajuato, L. de Retana 5, CP 36000 Guanajuato, Mexico

* Current address: Campus de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte. Km 33.5, Tablaje catastral 13615 Col. Chuburná de Hidalgo In, Merida, Yucatán, Mexico, C. P. 97203
* vmloyola@cicy.mx



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, De-la-Peña C, Alcazar-Magaña A, Wrobel K, Loyola-Vargas VM (2015) Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus. PLoS ONE 10(6): e0126414. doi:10.1371/journal.pone.0126414

Academic Editor: Hector Candela, Universidad Miguel Hernández de Elche, SPAIN

Received: February 16, 2015

Accepted: April 1, 2015

Published: June 3, 2015

Copyright: © 2015 Nic-Can et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the National Council for Science and Technology (157014 to V.M.L.V., 178149 to C.D.L.P.). G.I.N.C. was supported by a scholarship (213451) from the National Council for Science and Technology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Somatic embryogenesis is a powerful biotechnological tool for the mass production of economically important cultivars. Due to the cellular totipotency of plants, somatic cells under appropriate conditions are able to develop a complete functional embryo. During the induction of somatic embryogenesis, there are different factors involved in the success or failure of the somatic embryogenesis response. Among these factors, the origin of the explant, the culture medium and the *in vitro* environmental conditions have been the most studied. However, the secretion of molecules into the media has not been fully addressed. We found that the somatic embryogenesis of *Coffea canephora*, a highly direct embryogenic species, is disrupted by the metabolites secreted from *C. arabica*, a poorly direct embryogenic species. These metabolites also affect DNA methylation. Our results show that the abundance of two major phenolic compounds, caffeine and chlorogenic acid, are responsible for inhibiting somatic embryogenesis in *C. canephora*.

Introduction

The production of a whole plant from a single somatic cell is a clear confirmation that cells contain the genetic information necessary to develop a new and functional plant [1]. This process is known as somatic embryogenesis (SE), and is a powerful biotechnological process that allows the mass production of economically important cultivars. Furthermore, SE is also an attractive system to study the morphology, biochemistry, genetic and molecular mechanisms of embryo development [2]. This system is built on the concept of cellular totipotency, which is the ability of a single cell to divide and produce a complete and functional plant. A certain

subset of cells, under specific induction conditions, can generate embryogenic cells that lead to the initiation of the somatic embryo [1,3].

There are different factors involved in the success or failure of the SE response. Among these factors are the species, the origin of the explant, the culture medium, the type and concentration of the growth regulators used, the nitrogen and carbon sources, and the *in vitro* environmental conditions [4–6]. Another important factor that affects the SE response is the release of organic molecules by the explants into the culture medium. Some of the secreted molecules that have been demonstrated to induce or modulate the SE response [7–9] have been classified as polysaccharides, amino acids, growth regulators, vitamins [10], proteins and lipophilic molecules [11–13]. Other compounds, mostly secondary metabolites, have been found to inhibit the embryogenic response of the cells. For instance, in *Daucus carota*, SE is inhibited by a chemical compound of low molecular mass that is released in response to high density cell cultures [14]. This inhibitory compound was identified as 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HBA) [15] and its accumulation in embryogenic cell cultures suppresses the rapid division of cells, mainly at early globular stages, inhibiting SE. Subsequently, it was observed that during embryogenic induction in *Larix leptolepis*, some inhibitory factors present in the medium culture also affected the SE response [16]. These inhibitory molecules were isolated and identified as vanillyl benzyl ether (VBE) [17] and 4-[(phenylmethoxy) methyl] phenol (4-PMP) [18]. VBE causes aberrations, particularly in the suspensor, which arrest the nutrient supply and growth regulator flux, inhibiting the development of somatic embryos in *L. leptolepis*. Besides VBE, the presence of 4-PMP in the culture medium strongly suppresses SE [18]. The molecular mechanism by which secondary metabolites affect the SE response is not understood. However, it seems that epigenetic modulation could be involved [19–22].

It has been shown that DNA methylation is important for somatic embryo development [23–26]. For instance, in *Pinus nigra*, the higher levels of DNA methylation correspond to a non-embryogenic line, but low levels promote SE [27]. Similar events have also been reported in other species, such as *Rosa x hybrid* [28] and *Eleuterococcus senticosus* [29]. Furthermore, in both *D. carota* and *Cucurbita pepo*, the formation of embryogenic cells is related to an increase in DNA methylation levels [23,24]. It was also found that during the generation of pro-embryogenic mass (Pm), the methylation of DNA decreases, but it gradually reverts in accordance with embryo development [23]. More recently, similar events were observed during the SE of *C. canephora* [26], where the maturation of the embryo was marked by an increase in the levels of DNA methylation. In contrast, disturbances in DNA methylation patterns caused by 5-azacytidine (5-AzaC, demethylating agent) cause the loss of embryogenic potential in cultures of *Medicago truncatula* and *D. carota* [30,31] as well as in the early stages of *C. canephora* SE [26]. On the other hand, it has been shown that there exists a negative relation between phenolic compounds and the DNA methylation levels [32]. Several plant-derived compounds have been proposed as DNA methylation modulators, including polyphenols, alkaloids, organosulfur compounds and terpenoids, which have been found to have important functions [21,22]. However, the role of secreted molecules into the media has not been fully addressed.

C. arabica and *C. canephora* are the most important species of the genus *Coffea*. Some of the distinctive characteristics of these species are that *C. canephora* is resistant to some diseases, while *C. arabica* produces coffee of high quality. These species combined produce 100% of the commercial coffee around the world. The biology of the species makes them incompatible and unable to produce hybrids. However, plant tissue culture can be used to resolve this issue.

SE of *C. arabica* has been explored by several groups around the world [33–36]. The systems used by these groups take a large amount of time to produce somatic embryos. We have developed a SE method that produces viable embryos within a few weeks in *C. canephora* [37]. However, under the same induction conditions, *C. arabica* is not able to produce somatic embryos.

This background provides evidence that compounds released by somatic cells could determine whether the embryogenic process succeeds or not, somehow affecting DNA methylation. Therefore, the central aim of the present study is to assess whether the secondary metabolites secreted by *C. arabica* into the culture medium affect the SE response and DNA methylation in *C. canephora*, a highly embryogenic species. We found that the SE of *C. canephora* is disrupted by the metabolites secreted from *C. arabica*, which also affect DNA methylation.

Results

Differential response to somatic embryogenesis in coffee

In the present work, the plantlets from both species were subjected to the same *in vitro* preconditioning treatment with the growth regulators 1-naphthalene acetic acid (NAA) and kinetin (KIN), and then the explants were incubated with 6-benzyladenine (BA) to induce SE (see [Material and Methods](#); [Fig 1](#)). After 56 days under these conditions, SE development in both species was compared. In *C. arabica* ([Fig 2A](#)), the first morphological change observed in the explants, around 14 days after induction (dai), was a small amount of growth of dedifferentiated tissue around the explant, which was most visible between 21 and 28 dai. At 35 dai, an increase in the growth of dedifferentiated tissue was observed, but from day 42 to day 56 dai, cell proliferation stopped and both the callus-like structures and the explants showed a rapid phenolic oxidation and died. However, in the case of *C. canephora* ([Fig 2B](#)), the SE response was very efficient and the first changes in the explants were observed between 7 and 14 dai, with a thickening in the edge of the explant and the beginning of cell proliferation, which quickly increased between 21 and 28 dai, generating the so-called Pm. The high rate of cell division in Pm allowed the start of the first embryogenic stage, the globular (G), at 35 dai. The development of the next embryogenic structures, heart (H) and torpedo (T), were predominant from 42 to 49 dai and finally, at 56 dai, the cotyledonary (C) embryos were completely developed.

In order to evaluate SE development in both species more closely, the SE process was observed every week by scanning electron microscopy (SEM) ([Fig 3](#)). In the case of *C. arabica* ([Fig 3A](#)), while cell proliferation starts at seven dai, at 14 days the cellular growth is more evident, and it can be observed that the growth initiates in the wounded cells. Between 28 and 35 dai, the accumulation of cell proliferation begins to break the epidermal cells of the explant, and between 42 to 49 dai, it is possible to observe semi-organized structures, which are more evident at 56 dai. These structures could correspond to early embryogenic stages such as globular-like structures. However, we observed several morphological defects; for instance, the presence of non-embryogenic cells as well as the absence of protoderm ([Fig 3A](#), 56 dai), which is crucial to normal embryo development [8].

On the other hand, when we observed, through SEM, the development of SE in *C. canephora* ([Fig 3B](#)), we found interesting similarities and important differences in comparison with *C. arabica* ([Fig 3A](#)). For instance, SE in *C. canephora* proceeds similarly to *C. arabica* during the first 14 dai. However, cell growth and proliferation in *C. canephora* was more active and abundant, allowing the establishment of the Pm between 21 and 28 dai. At day 35 dai in *C. canephora*, the cells' organization leads to the formation of the G stage, which is characterized by its spherical form and the presence of the protoderm. Then, by 42 dai, it can be observed that the embryos previously in the G stage have developed into H embryos, the Pm has increased, and the generation of new G embryos has also increased. During the last two weeks, important changes were observed in the SE of *C. canephora*. First, at the H stage, the elongation of the embryo and the development of cotyledonary primordia allow the formation of the T stage, which is the quickest transition into the C embryo stage. Since SE is an asynchronous

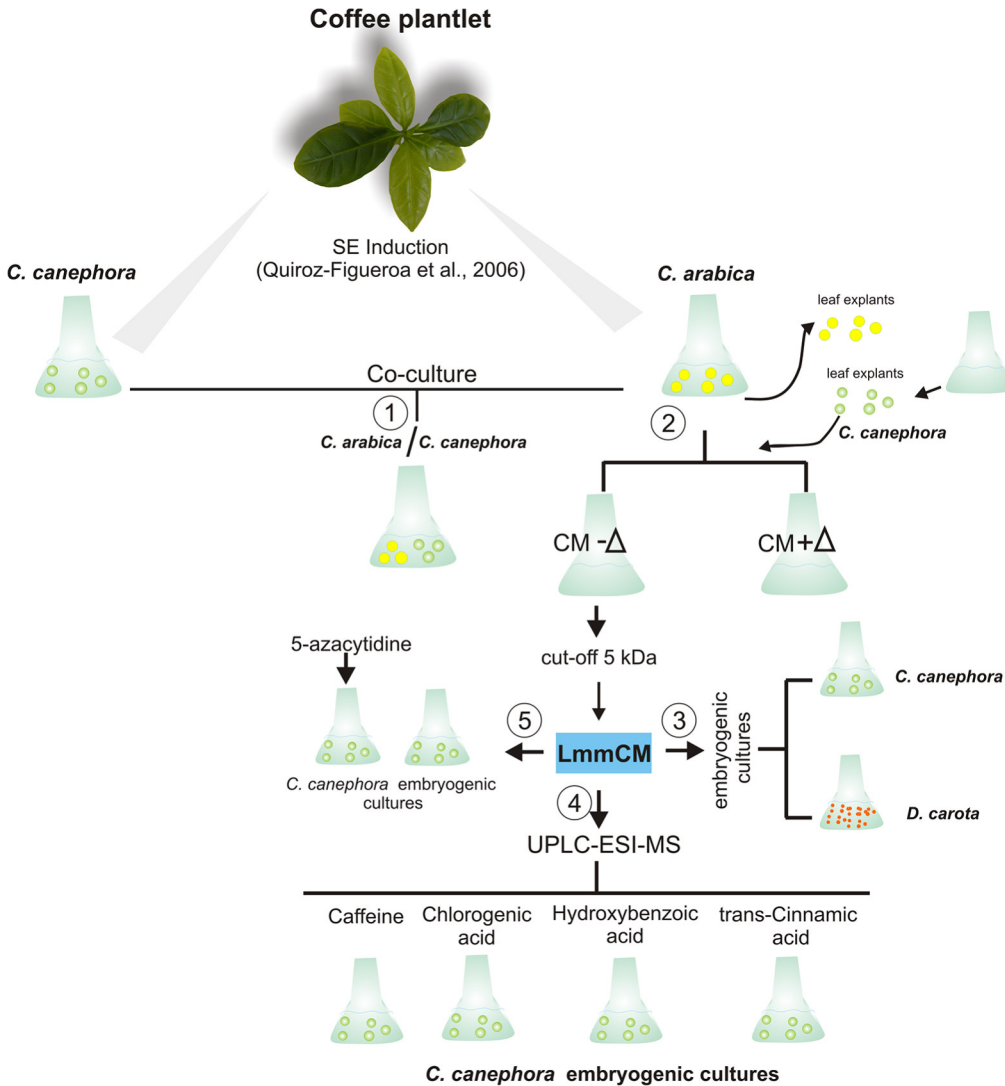


Fig 1. Schematic representation of the experimental procedure used in this study. Leaf explants of *Coffea arabica* (Ca) and *C. canephora* (Cc) were cultivated in the somatic embryogenesis (SE) induction media. In order to evaluate the factors involved in the inhibition of SE in Ca, the next steps were followed: 1. Ca and Cc explants were co-cultured together in the same medium. 2. The explants from Ca were discarded and the conditioned medium (CM) was used either fresh (CM-Δ) or autoclaved (CM+Δ) to culture the Cc explants. 3. The CM from seven days was fractionated with a 5 kDa cut-off membrane and the LmmCM obtained was added into the embryogenic cultures of Cc and *Daucus carota* (Dc). 4. The LmmCM was analyzed by GC-MS or UPLC-ESI-MS and the commercial identified phenolic compounds were added to Cc cultures. 5. The effect of LmmCM in DNA methylation was compared with that of the 5-azacytidine. Green circles: Cc leaf explants; yellow circles: Ca leaf explants; orange circles: Dc embryogenic cells.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g001

process, by 56 dai it is possible to observe all the embryogenic stages, and yet it is possible to distinguish the proliferation of new G embryos (Figs 2B and 3B).

Compounds secreted by *Coffea arabica* explants inhibit SE in other species

Previous reports have indicated that one of the reasons why an explant does not respond to *in vitro* culturing is the secretion of inhibitory compounds into the culture medium [38,39]. In this context, we wondered whether the impaired SE in *C. arabica* is due to extracellular compounds released into the medium. Therefore, we added 21 dai *C. canephora* explants into the

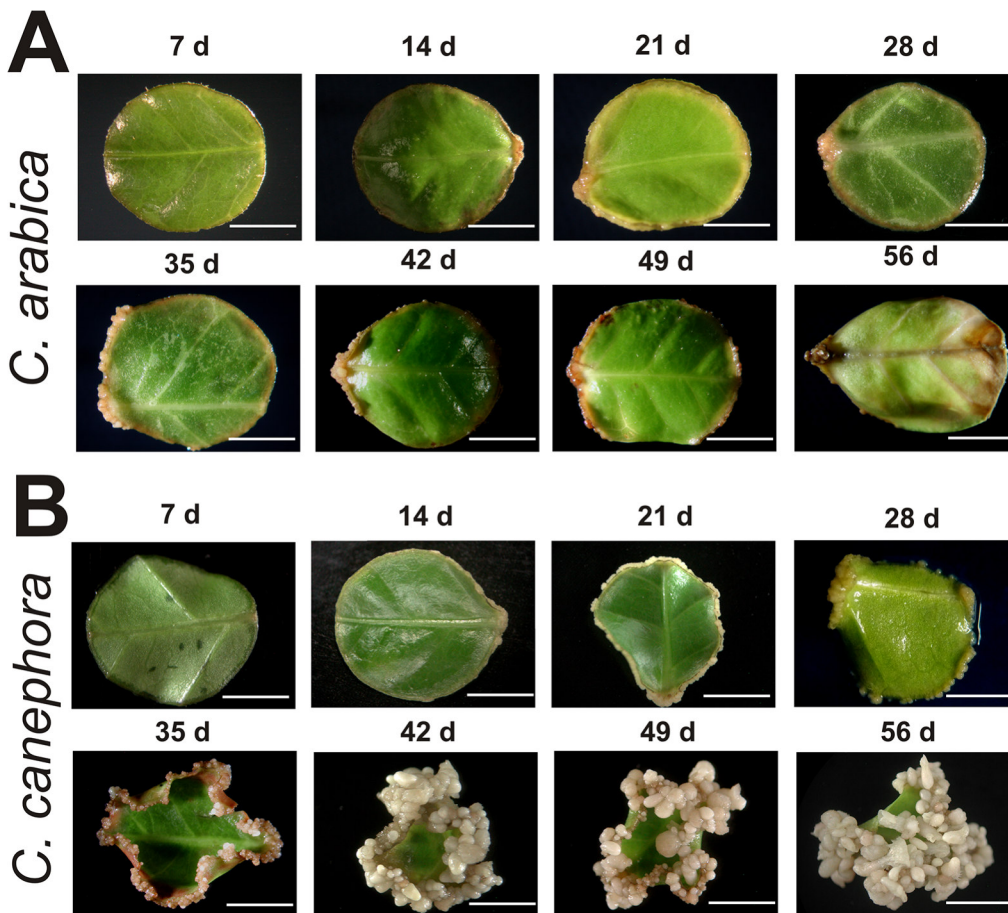


Fig 2. The somatic embryogenesis process in *Coffea arabica* and *C. canephora*. Leaf explants were cultured in liquid medium using 5 μ M of 6-benzyladenine. A. Leaf explants of *C. arabica* during the 56th day of somatic embryogenesis induction. The samples were taken every seven days. B. Leaf explants of *C. canephora* during the somatic embryogenesis process. The samples were taken every seven days. Bars = 5 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g002

medium of 7 dai *C. arabica* and co-cultured them together for two weeks (Fig 4B; See Fig 1, step 1). Surprisingly, we found that the co-culture of *C. arabica* and *C. canephora* negatively affects the development of the SE process in *C. canephora*; this negative effect was reflected by a significant reduction in cell proliferation of the Pm and a rapid phenolic oxidation around the explant, which was more evident three weeks after the co-culturing (Fig 4C). This finding strongly suggests that the explants of *C. arabica* release inhibitory molecules into the culture medium, impairing even a highly embryogenic process.

To determine whether the inhibitors in the conditioned medium (CM) of *C. arabica* and, therefore, their effects accumulate during the period of culture, we cultured explants of *C. canephora* of 21 dai in CM of *C. arabica* of 7, 14 and 21 dai without any additional treatment (Fig 5; See Fig 1 step 2). The embryogenic response of *C. canephora* was evaluated every seven days (Fig 5A), and the results of the formation of total somatic embryos on the CM were accounted for after 35 days of incubation (Fig 5B). It was found that the CM of *C. arabica* at any time point was able to inhibit the embryogenic process in *C. canephora*. The CM from seven dai inhibited the SE of *C. canephora* more strongly (~93%), while the CM from 14 and 21 days reduced the embryogenic response by 80% in comparison with the control (Fig 5B). Additionally, in order to know whether the inhibitory compounds were heat-resistant, the CM

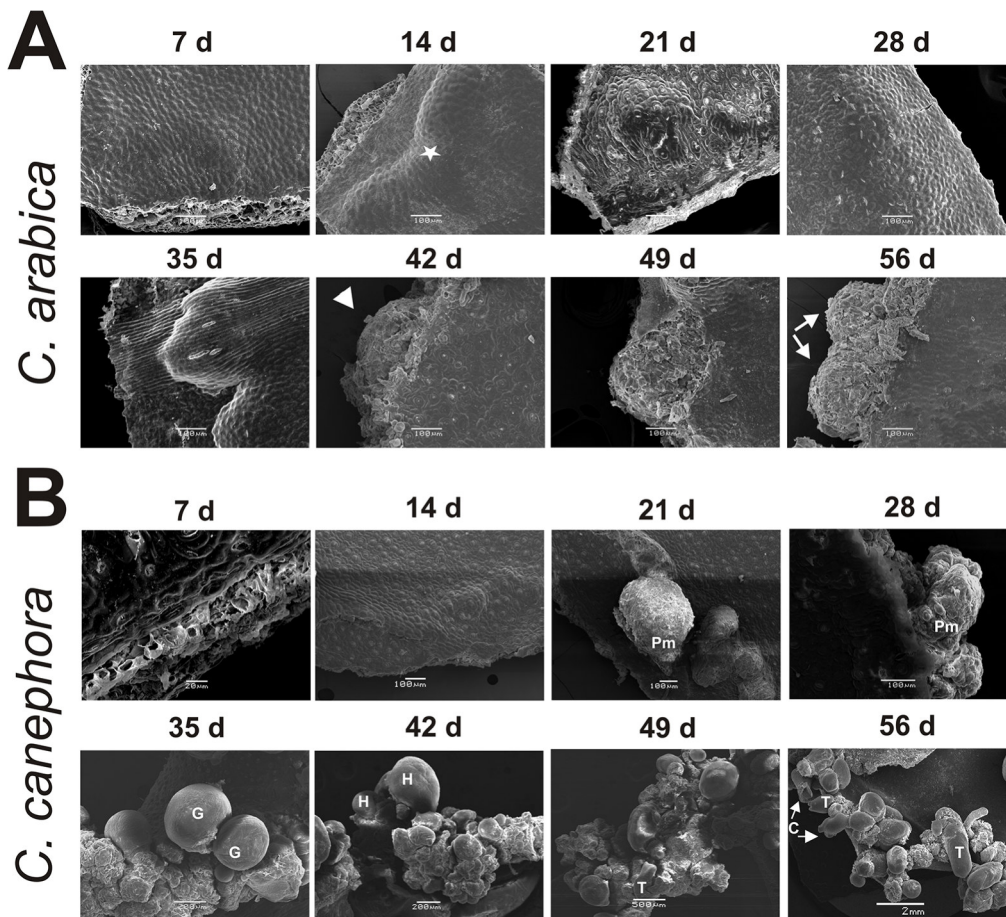


Fig 3. Scanning electron microscopy (SEM) examination of the explants of *Coffea arabica* and *C. canephora* under embryogenic conditions. A. SEM of *C. arabica* explants during the 56-day somatic embryogenesis process. The white star indicates the cellular growth, and the white arrows show the generation of proembryogenic mass-like structures at 42 days and the development of a globular-like stage with an aberrant surface at 56 days. B. SEM of *C. canephora* explants during the somatic embryogenesis process. At 21 and 28 days after induction (dai), the proembryogenic mass (Pm) emerging from the mesophyll region of the explant is shown. The globular stage (G) appears after five weeks, with a well-differentiated protoderm structure. Heart stages (H) can be observed at 42 dai, torpedo stage (T) at 49 dai and cotyledonary stage (C) at 49 and 56 dai.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g003

from 7, 14 and 21 dai was autoclaved (+Δ) and used as in the previous experiment. Under this condition, a small increase in the embryogenic response was observed, such as a gradual increase in the number of somatic embryos, depending on the age of the CM used. For instance, when the CM was heated, the amount of *C. canephora* embryos in the H stages was higher in comparison with the CM that was not heated, although the embryos at T or C stages did not change in either condition (Fig 5B), indicating that the secreted inhibitory compounds from the CM of *C. arabica* are heat-resistant.

Since when we add CM we are also adding inorganic salts, we performed an experiment to rule out the effect of the inorganic components of the Yasuda medium. We extracted the CM with ethyl acetate and used the components in the organic phase to inhibit SE in *D. carota* (S1 Fig). The inhibitory effect was the same as that of the CM without the ethyl acetate partition, suggesting that the inhibition was not due to the presence of additional inorganic salts.

It has been reported that chemical factors implicated in the impairment of SE are substances of low molecular weight [14,16]. Therefore, in order to test this theory, the CM of *C. arabica* from 7, 14, 21 and 28 dai was separated by molecular mass, through a 5 kDa cut-off membrane

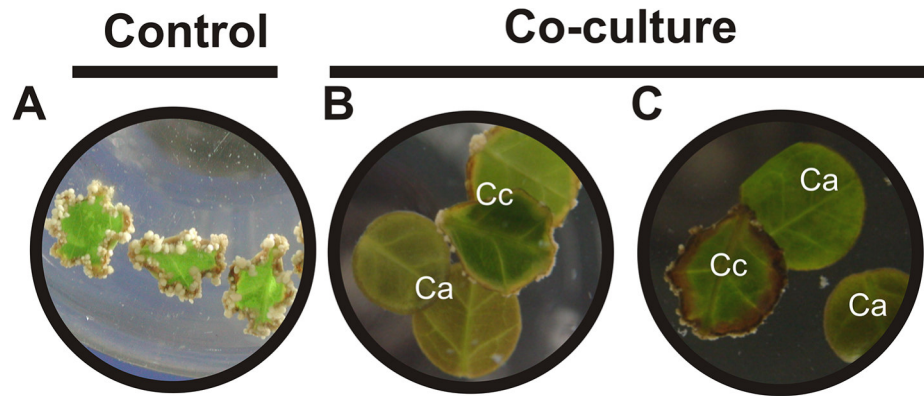


Fig 4. Inhibition assays during the somatic embryogenesis of *C. canephora*. A. *C. canephora* control after 42 dai with any treatment. Embryogenic explants of *C. canephora* (Cc) 21 dai were co-cultured together with 7-day-old explants of *C. arabica* (Ca). B. The picture was taken one week later. C. The picture was taken three weeks later.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g004

(Fig 1, step 3), and the fraction LmmCM was tested in *C. canephora* and *D. carota* SE (Fig 6). The LmmCM was added separately to the embryogenic culture of 21 dai *C. canephora*, and the embryogenic response was evaluated at day 35. It was observed that the presence of LmmCM from 7 dai dramatically reduced the embryonic response, up to 95.5%, whereas the LmmCM from 14, 21 and 28 dai caused an inhibition between 81% and 83%, respectively (Fig 6B). In the case of the embryogenic culture of *D. carota*, the LmmCM was added at the beginning of the embryogenic induction, and the embryogenic response was evaluated after 14 days. The embryogenic response in *D. carota* was also inhibited (Fig 6A), particularly the LmmCM collected from 7 dai, which strongly stops the development of the embryogenic structures (Fig 6C). These results indicate that the inhibitory molecule(s) present in the CM of *C. arabica* can

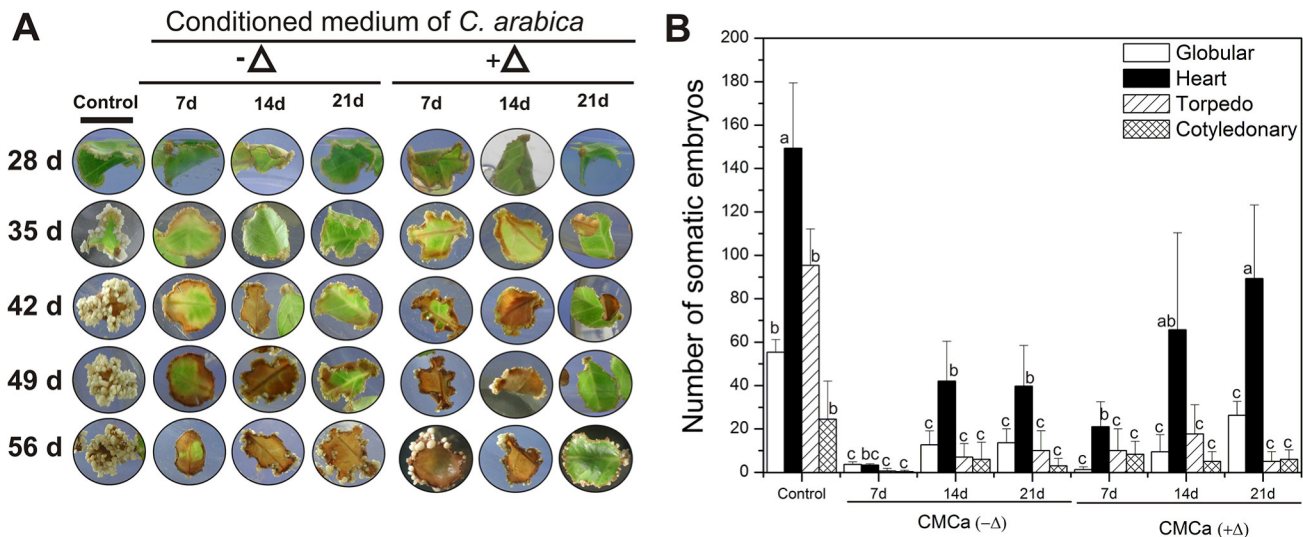


Fig 5. Effect of the conditioned medium of *C. arabica* on the formation of somatic embryos in *C. canephora*. A. Temporal course of explants from *C. canephora* leaves under embryogenic induction without (control) or with the presence of the conditioned medium (CM) of *C. arabica* fresh (-Δ) or autoclaved (+Δ) from 7, 14 and 21 dai, as indicated in Materials and Methods. B. The embryogenic response of *C. canephora* evaluated after five weeks without (control) or with the presence of CMCa-Δ and CMCa+Δ. Error bars represent the SE ($n = 3$). Bars marked with different letters indicate statistically different values between each embryogenic stage at a given time according to a Tukey test ($P \leq 0.01$). The experiment was carried out independently three times.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g005

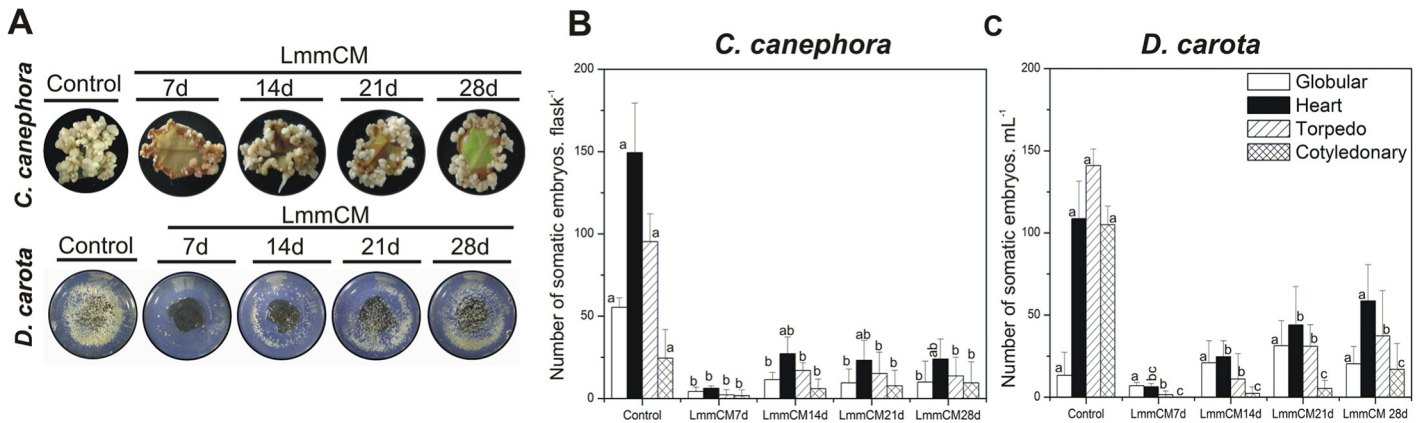


Fig 6. Effect of low molecular mass compounds secreted by explants of *C. arabica* on the embryogenic cultures of *C. canephora* and *D. carota*. A. Morphological effects on the explants of *C. canephora* and suspension cells of *D. carota* under embryogenic conditions treated with low molecular mass of conditioned medium (LmmCM). B. Fraction of LmmCM of *C. arabica* of 7, 14, 21 and 28 dai was added to the embryogenic cultures, and its effect was plotted against the number of somatic embryos generated. C. The LmmCM of 7, 14, 21 and 28 days was added at the beginning of embryogenic induction in *D. carota*. The LmmCM of 7, 14, 21 and 28 days was added at 21 days after the embryogenic induction in the embryogenic cultures of *C. canephora*. The number of somatic embryos in *C. canephora* and *D. carota* at different developmental stages was counted at 56 and 14 days, respectively. Controls were cultivated in the absence of LmmCM. Error bars represent the standard error ($n = 3$). Different letters in bars represent the statistical significance of mean differences between each embryogenic stage at a given time according to the Tukey test ($P \leq 0.01$). The experiment was carried out three times.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g006

impair the embryogenic development of highly embryogenic cultures such as *C. canephora* and *D. Carota*.

Identification of the chemical nature of the secreted compounds by *Coffea arabica* explants

In order to identify which compounds are present in the LmmCM fraction from seven dai, we analyzed, by GC-MS and UPLC-ESI-ITMS, the CM from *C. arabica* as described in Materials and Methods. It was found by GC-MS analysis that the LmmCM is composed of one prominent compound, which was identified as caffeine, whereas hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acid showed lower signal intensity (S2 Fig). The analysis of the LmmCm fraction by UPLC-ESI-ITMS led to the identification of the eight compounds listed in Table 1. As all of the compounds were tentatively identified as phenolics, we included 34 phenolic compounds as standards (S1 Table). The compounds 1–32 were run in negative ionization mode, whereas compounds 27, 33 and 34 were operated in positive ionization mode. Using the standards as a guide, as well as the retention time and extracted ion chromatograms, we detected and

Table 1. Concentration of small phenolic compounds identified in two independent samples of LmmCM from *C. arabica* by UPLC-ESI-ITMS.

Phenolic compound	LmmCM ₁ (μmoles.flask ⁻¹)	LmmCM ₂ (μmoles.flask ⁻¹)
Benzoic acid	0.26	0.39
Caffeine	11.042	10.982
Caffeic acid	0.017	0.039
Catequine	0.034	0.087
Chlorogenic acid	1.715	1.986
Epicatequine	0.029	0.050
Ferulic acid	0.0178	0.024
Salicylic acid	0.186	0.275

doi:10.1371/journal.pone.0126414.t001

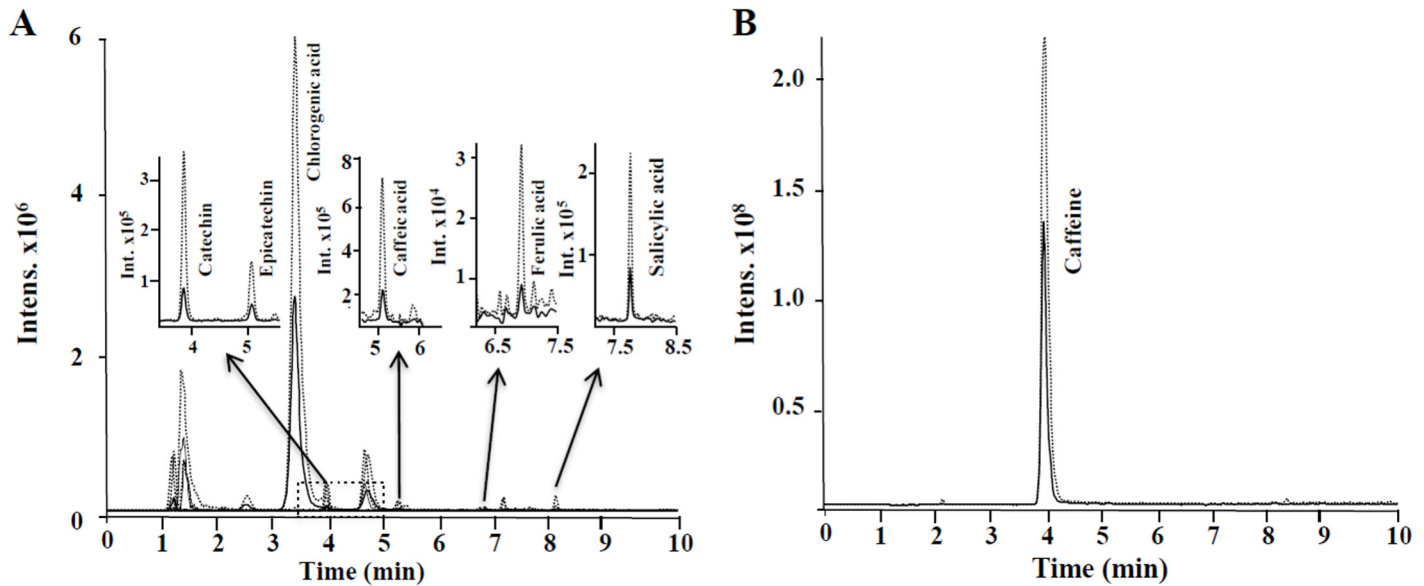


Fig 7. Selected extracted ion chromatograms obtained of LmmCM from *C. arabica* by UPLC-ESI-ITMS. A. Phenolic compounds detected in negative electrospray ionization mode. B. Caffeine was detected under positive electrospray ionization. Concentrations of phenolics compound are listed in Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g007

quantified eight phenolic compounds (Fig 7) from two independent experiments. Among the identified compounds, the benzoic, ferulic, salicylic and caffeic acids, as well as catechine and epicatechine, were present in low concentrations in the LmmCM, whereas chlorogenic acid and caffeine represent 98% of the phenolic compounds identified (Table 1).

Effect of caffeine, chlorogenic, hydroxybenzoic and trans-cinnamic acids on the formation of somatic embryos on *C. canephora*

We tested whether the two most abundant metabolites, caffeine and chlorogenic acid, as well as hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acids found in very low concentration, exert a negative response on the SE of *C. canephora*. Caffeine, chlorogenic acid, hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acid were added (Fig 1, step 4) in the induction medium of *C. canephora* at different concentrations (1, 10, 100 and 1000 μ M; Fig 8). It was found that the addition of 1 μ M of caffeine into the induction medium of *C. canephora* reduced the embryogenic potential by 41.3% (Fig 8A) whereas at 10 μ M and 100 μ M, the inhibition was 75 and 81%, respectively. Interestingly, it was observed that caffeine at the highest concentration (1,000 μ M) still allowed the formation of some embryos. In the case of chlorogenic acid, its addition to the medium at concentrations of 1 and 10 μ M caused a reduction in the embryogenic response of 52 and 65%, respectively, compared with the control (only with DMSO) (Fig 8B). The data show that the presence of chlorogenic acid in the induction medium strongly inhibited the transition of the H stages to T and C stages, while the same compound added at 100 and 1,000 μ M caused a total SE inhibition. In addition, the presence of hydroxybenzoic acid at concentrations of 1, 10 and 100 μ M moderately decreased the total number of somatic embryos (3.4, 27.6 and 41.3%, respectively) in comparison with the control (Fig 8C), whereas trans-cinnamic acid at the same concentrations has a more inhibitory effect on SE, mostly in the T and C stages (Fig 8D). However, it was also observed that both compounds added at 1,000 μ M totally abolished embryo formation.

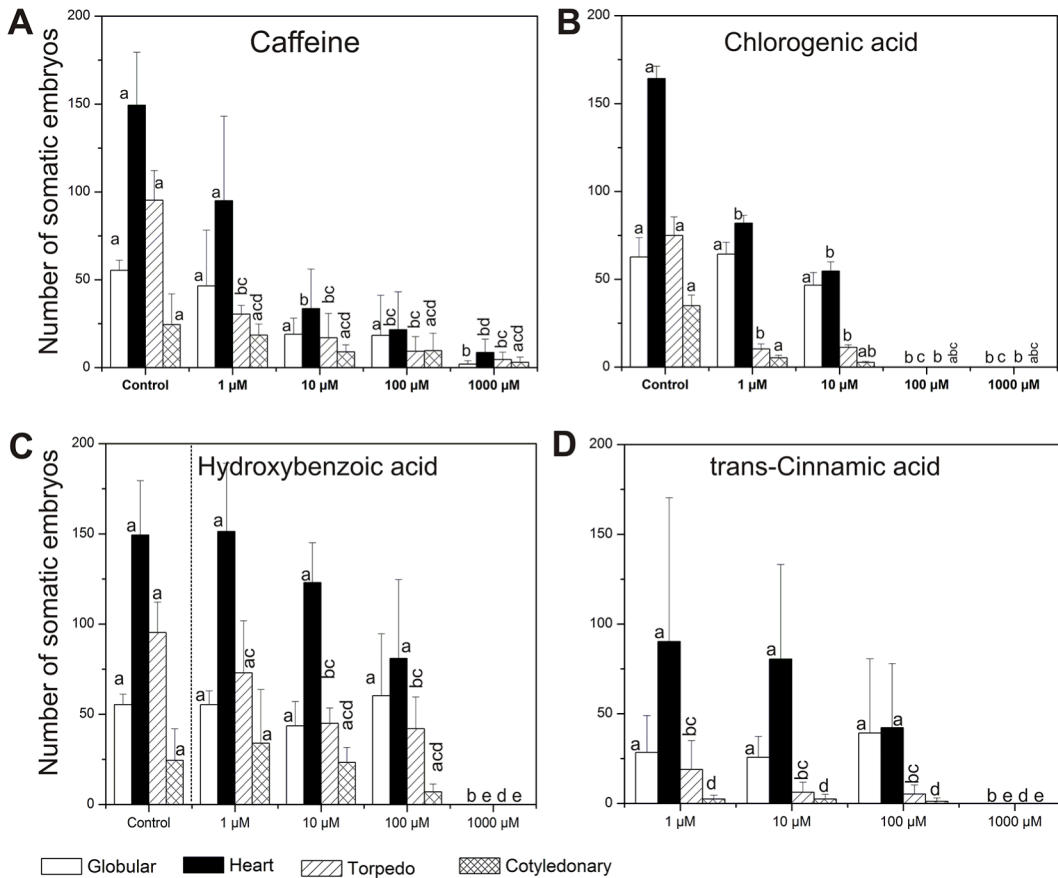


Fig 8. Effect of caffeine, chlorogenic acid, hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acid in the somatic embryogenesis of *C. canephora*. Explants from *C. canephora* leaves under embryogenic induction were supplemented with four different concentrations (1 µM, 10 µM, 100 µM and 1,000 µM) of A. Caffeine; B. Chlorogenic acid; C. Hydroxybenzoic acid, and D. Trans-cinnamic acid, at 7 dai. In contrast to the other compounds, which were diluted in the same culture medium, chlorogenic acid was diluted with dimethyl sulfoxide, which was used as a control. The number of every somatic embryo stage (globular, heart, torpedo and cotyledonary) was counted after 56 dai with and without (control) the phenolic compounds. The bars represent the mean ± SE ($n = 3$). Bars marked with different letters indicate statistically different values between each embryogenic stage at a given time according to the Tukey test ($P \leq 0.01$). The experiments were performed three times.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g008

LmmCM inhibits SE and decreases DNA methylation in *Coffea canephora*

Recent reports have shown a correlation between DNA methylation, one of the most studied epigenetic mechanisms, and the embryogenic capacity in plants [25,31,40,41]. It has also been documented that plant-derived compounds, such as polyphenolic compounds, have the ability to act as DNA methyltransferase inhibitors [22]. In our analysis several phenolic compounds were detected from LmmCM (Fig 7, Table 1). Therefore, we wondered whether the inhibition of SE in *Coffea* by LmmCM is due to changes in DNA methylation. We analyzed global DNA methylation of both *C. arabica* and *C. canephora* explants every seven days, under embryogenic conditions, for 49 days (Fig 9A). It was observed that during the embryogenic induction process of *C. canephora*, 5-methyl-2'-deoxycytosine (5mdC) levels were higher than those of *C. arabica*, except for day 21, when both species had 22.5% DNA methylation (Fig 9A). Day 21 is the day related to the beginning of cell proliferation on the edge of the explant (Figs 3 and 4). However, unlike *C. canephora*, which maintains DNA methylation levels during the SE process, *C. arabica* presented a rapid decrease in DNA methylation levels, from 22.5% to 12% (Fig

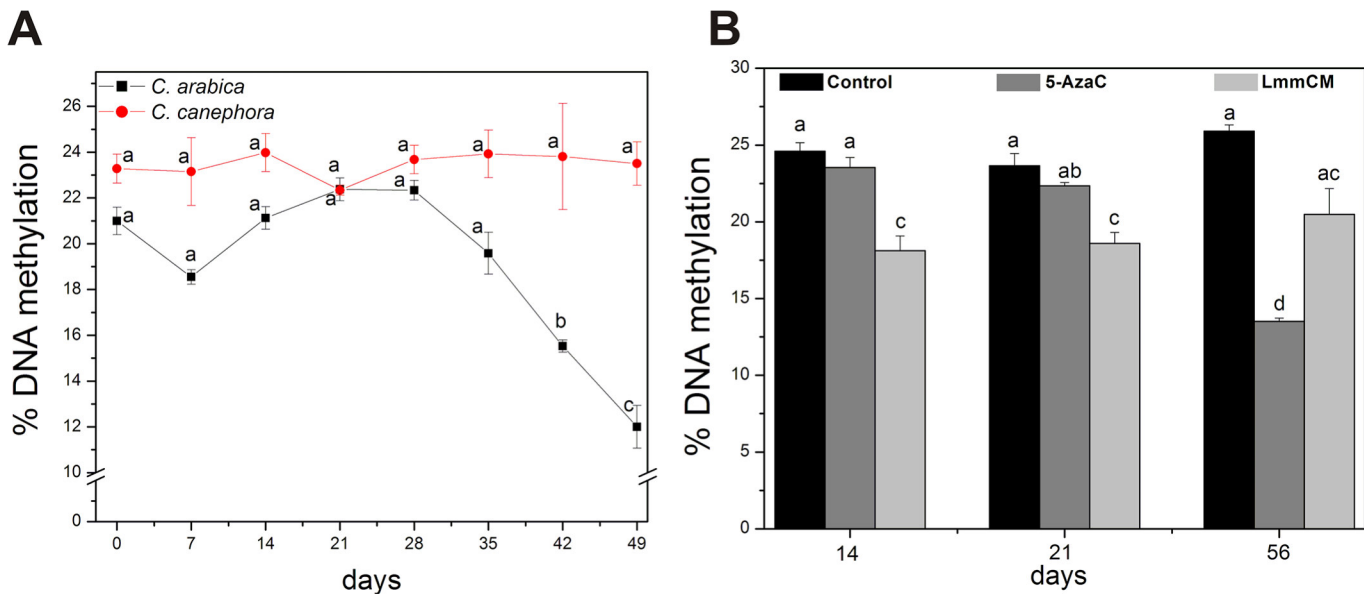


Fig 9. Global DNA methylation levels during the embryogenic induction of *C. arabica* and *C. canephora* and the effect of LmmCM on DNA methylation. A. Percentage of DNA methylation from explants of *C. arabica* and *C. canephora* under embryogenic induction conditions. B. Percentage of DNA methylation during the SE of *C. canephora* in normal conditions (control), 10 μ M of 5-azacytidine (an inhibitor of DNA methylation) and with LmmCM from 7 dai *C. arabica*. 5-azacytidine was added every 7 days from day 7 until day 49 and the fraction of LmmCM was added only one time, at day 7 after the induction. Error bars represent the SE ($n = 3$). Bars marked with different letters indicate statistically different values between each embryogenic stage at a given time according to the Tukey test ($P \leq 0.01$). Each experiment was carried out three times.

doi:10.1371/journal.pone.0126414.g009

9A). Once we indeed found changes in DNA methylation levels between *C. arabica* and *C. canephora* (Fig 9A), we assessed whether the LmmCM of *C. arabica* from 7 dai affects the DNA methylation in *C. canephora* at 14, 21 and 56 days after the induction of SE (Fig 9B). We compared the effect of the LmmCM with that of 5-AzaC at 10 μ M (Fig 1, step 5). It was observed that the effect of LmmCM on DNA methylation was higher than that of 5-AzaC 10 μ M at 14 and 21 dai, and this effect remained after 56 dai.

Discussion

SE is a powerful and useful tool to understand the morphogenetic processes that occur during the development of plant embryogenesis [3]. Although the molecular changes by which somatic embryos are generated have been investigated [42–46], the mechanism by which the somatic cell transforms into the somatic embryo is still unknown. SE induction in some species seems to be more responsive to the embryogenic pathway than in others, even those from the same genus [47]. It has been proposed that the failure of SE induction in some plants is due to the secretion of compounds into the medium [15,17,18,39,48]. Therefore, we evaluated the SE response of *C. canephora* (a highly direct embryogenic species) in the presence of *C. arabica* (a deficient direct embryogenic species) explants (Fig 4), and it was observed that in the presence of *C. arabica*, SE in *C. canephora* was disrupted. This finding indicates that some substance in the surrounding medium of *C. arabica* affects SE in *C. canephora*. Some reports have even highlighted that the inhibition of SE development is produced by the accumulation of low molecular mass molecules in cultures with high cell density [14,16]. Our results show that in *C. arabica*, the SE-inhibitory compounds accumulate in the culture medium as early as seven dai (Fig 5), and they have a molecular mass lower than 5 kDa (Fig 6). In cultures of carrot and *L. leptolepis*, low molecular mass compounds such as 4-HBA, VBE and 4-PMP were identified as

inhibitors of the SE response, suppressing rapid cell divisions and the development of the suspensor, respectively [15,17,18]. Therefore, we tested the 4-HBA to see whether this compound, which was not detected in any of the samples tested (S3 Fig), affects the SE of *C. canephora* (S4 Fig). We found that 4-HBA moderately reduced the number of embryogenic structures in *C. canephora* when it was added at the beginning of the induction, in comparison to the response of the LmmCM isolated from *C. arabica*. Unlike 4-HBA, which seems to be very specific to carrot, the LmmCM of *C. arabica* has a more broadly negative effect, as was demonstrated in carrot as well as coffee explants (Fig 6).

Phenolic compounds can accumulate in the culture medium, interfering with the SE process [39,49]. Therefore, from the metabolites identified by GC-MS and UPLC-ESI-ITMS (Fig 7, Table 1 and S2 Fig), we selected four compounds (caffeine, chlorogenic acid, hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acid), two very abundant in the LmmCM and two present in low amounts, and evaluated them in a pure form during the embryogenic response of *C. canephora* (Fig 8). We found that caffeine, even at the lowest concentration of 10 μM , strongly decreases the SE process in *C. canephora* (Fig 8A) and this compound is secreted into the culture medium, particularly in *C. arabica* (Fig 7). In contrast to chlorogenic acid, hydroxybenzoic acid and trans-cinnamic acid, caffeine even at the highest concentration (1,000 μM) allows somatic embryos to develop in *C. canephora* (Fig 8A). Similar results have also been observed during the development of zygotic embryos in coffee; these embryos have the ability to avoid caffeine autotoxicity [50]. The growth of the hypocotyl allows the root tip to move away from the caffeine-rich endosperm and facilitates the initiation of cell divisions in the root tip. On the other hand, caffeine accumulates in the cotyledons only after the cell division ends there, suggesting that the accumulation of caffeine is separated by space and time as a way to avoid autotoxicity [50]. At the molecular level, it has been found that the application of caffeine during the growth of the root meristem of *Allium cepa* induces chromosomal aberrations during cell proliferation, especially during the G2 phase and the mitotic prophase [51]. Furthermore, several studies indicate that this compound also inhibits cell plate formation during cytokinesis in plants [52–54].

It is worth noting that when chlorogenic acid was applied to *C. canephora* cultures, it was observed that its presence drastically decreased embryo production, up to 52% with a concentration of 1 μM (Fig 8B). This compound also interrupts embryo development beyond the H stage, whereas at concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$ the SE process was completely inhibited. At present, the physiological role of chlorogenic acid in SE is not clear; however, it is known that high concentrations of caffeine are accompanied by a considerable accumulation of chlorogenic acid, as a pathway to form a complex to store the caffeine in the vacuole [55]. It was also observed that during coffee germination the concentration of chlorogenic acids decreases and the caffeine is released, whereas during leaf expansion an accumulation of both compounds occurs [56].

It was found that hydroxybenzoic acid at 100 μM concentration moderately inhibited SE (Fig 8C), indicating that this compound is not the responsible for the inhibition found in the SE of *C. canephora*. This result is consistent with previous reports, which indicate that the presence of hydroxybenzoic acid in the embryogenic cell suspension of carrot slightly decreases somatic embryo formation [48,57]. Moreover, the addition of trans-cinnamic acid to the cultures of *C. canephora* at the same concentration (100 μM) caused an important reduction in the formation of embryogenic structures, principally at the T and C stages, which are practically suppressed in comparison to the other treatments used (Fig 8D). Similar observations were also reported by Liu et al. [58], who found that embryos in the globular stage of *Brassica juncea* treated with trans-cinnamic acid (an auxin polar transport inhibitor) induce the fusion of cotyledons. This suggests that the correct polar transport of auxin from the early globular embryo

stages is crucial for their transition to more mature embryogenic stages [59]. In addition, it has been found that hydroxycinnamic acid is accumulated principally in lines susceptible to browning, affecting SE in date palm [60]. On the other hand, the reduction of the cinnamic acid content stimulates cell division and promotes the development of early embryo structures in oak [61]. According to these results, a high concentration of trans-cinnamic acid, like that used with *C. canephora* (Fig 8D) could be related to the phenolic oxidation of the explants, leading to aberrations at the beginning of Pm development and preventing the generation of somatic embryos. It has been also suggested that hydroxycinnamic acid as well as the chlorogenic acid could be required to reinforce the cell wall, since these compounds, and their derivatives, are necessary to the lignification process [56,62]; probably modifying cell plasticity and interfering with the embryogenic response [60]. The results suggest that differential accumulation of phenolic compounds, in the culture medium of *C. arabica*, could be a major cause of the interruption in the cell division pattern affecting cellular proliferation and the SE process.

On the other hand, the regulatory mechanism by which secondary metabolites interfere with the SE process is still unknown. However, it has been reported that polyphenols, alkaloids, terpenoids and catechins, among others, can induce the loss of DNA methylation [21,22,32]. Our analysis allowed us to determine that LmmCM is composed of caffeine and chlorogenic acid, which both represent 98% of the phenolic compounds in the CM, as well catechin, epicatechin, and caffeic acid (Table 1), compounds that have been shown to have similar effects on DNA methylation [21,63,64]. Therefore, we assessed whether the LmmCM has any effect on DNA methylation and, thus, could be a mechanism by which SE is prevented in coffee (Fig 9). It was found that there is an important difference in the methylation levels between *C. canephora* and *C. arabica* (Fig 9A). *C. arabica* presented a 5% less DNA methylation rate than *C. canephora* at seven days after induction of SE. This result suggests that the inhibitory molecules present in the LmmCM could stimulate directly or indirectly the loss of DNA methylation (even more than 5-AzaC, Fig 9B), by a mechanism that needs to be further investigated.

It has been observed that caffeic acid and chlorogenic acid, two phenols isolated from coffee plants, inhibit the activity of DNA methyltransferases, particularly through a non-competitive mechanism due to an increase in the levels of S-adenosyl-L-homocysteine (SAH, an inhibitor of DNA methylation) [21]. Furthermore, the accumulation of SAH has also been reported during the biosynthesis of caffeine [65]. Since DNA methylation and the biosynthesis of caffeine require the same reserves of SAM, the reduction of SAM to SAH can generate a feedback inhibition of various SAM-dependent methylation processes [21]. In addition, there are reports indicating that other phenolic compounds can also inhibit DNA methyltransferase activity [21,22]. These findings suggest that the molecules present in the LmmCM, mainly phenolic compounds, could interfere with the activity of DNA methyltransferases in *C. arabica* and, therefore, disrupt the SE process. However it could also be possible that the decrease in DNA methylation is a consequence of the impaired SE process, with the phenolics acting upstream.

In conclusion, our results provide evidence that extracellular molecules of low molecular mass can negatively modulate the SE response and affect DNA methylation. Moreover, we showed that the release of caffeine and chlorogenic acid into the culture medium of *C. arabica* strongly impaired the SE process in *C. canephora*. Further investigations are needed to determine how these compounds affect DNA methyltransferases in this plant, and which genes are epigenetically regulated.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

The buds used in this study were collected from plants cultivated in our research institute, Centro de Investigación Científica de Yucatán (Scientific Research Center of Yucatan), in

consequence no specific permissions were required for these locations/activities. This research does not involve endangered or protected species.

Segments from buds of *C. arabica* derived from plants in the field were washed and disinfected with 5% Extran and 6% NaClO₃ and rinsed with sterile distilled water. The sterile buds were cultured *in vitro* in shoot induction medium MS salts [66] supplemented with 2.96 μM thiamine-HCl, 550 μM myo-inositol, 4.06 μM nicotinic acid, 2.43 μM pyridoxine, 26.64 μM glycine, 31.6 μM cysteine, 116.85 μM sucrose, 62.5 μM BA and 0.25% (w/v) gelrite, pH 5.8 and cultured at 25 ± 2°C under a 16/8h (light/darkness) photoperiod (150 μmol m⁻² s⁻¹). Plantlets obtained from shoot induction were isolated and cultured in MS medium supplemented with 11.86 μM thiamine-HCl, 550 μM myo-inositol, 158 μM cysteine, 8.12 μM nicotinic acid, 87.64 mM sucrose and 0.25% (w/v) gelrite, pH 5.8. *C. canephora in vitro* plants were cultured under the same conditions as *C. arabica*.

D. carota seeds were sterilized with 70% ethanol and 20% NaClO₃ for 3 min and rinsed three times with distilled sterile water and cultured *in vitro* in semisolid B₅ medium [67] for 7 days at 25 ± 2°C under a 16/8h (light/darkness) photoperiod (150 μmol m⁻² s⁻¹). Segments 2–4 mm in length were excised from seedlings' hypocotyls, and then two grams of tissue were transferred onto liquid B₅ medium supplemented with 11.4 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and maintained at 100 rpm under the same conditions described above to generate cell suspension. Cell suspensions were subcultured every 14 days.

Somatic embryogenesis induction

Plantlets of *C. arabica* and *C. canephora* were subjected under the same conditions of culture for direct embryogenic induction. Briefly, both species were pre-conditioned for 14 days in MS medium supplemented with 0.54 μM NAA and 2.32 μM KIN under the same growth conditions described above. Leaves of plantlets were cut into segments of 0.25 cm², and five explants were inoculated in 50 mL liquid Yasuda modified medium contained in 250 mL flasks as previously described [37] in the presence of 5 μM BA and cultured at 25 ± 2°C in dark conditions at 55 rpm.

For embryogenic induction of *D. carota*, small clusters of cells were collected from seven-day-old high-density cell suspension through a stainless steel sieve of 50 μm, and then the cells were washed three times with liquid B₅ medium without 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and suspended in this same medium. Finally, 50 μL of packed volume cells were inoculated in 50 mL of this same medium, producing low-density cultures.

Electron microscopy

Leaf explants of both coffee species under embryogenic induction were collected every 7 days during a temporal course of 56 days. Both sets of samples were fixed and treated as described previously [26] and analyzed with a scanning electronic microscope (GEOL JSM 6360 LV).

Bioassays with conditioned medium of *Coffea arabica*

To evaluate the role of possible factors involved in the inhibition of SE response in *C. arabica*, we used the following strategies: first, the embryogenic explants of *C. canephora* 21 dai were co-cultured together with explants of *C. arabica* in the same medium seven dai (Fig 1). Second, the explants from 7, 14 and 21 dai under embryogenic conditions of *C. arabica* were removed and the medium (conditioned medium; CM) was used to culture embryogenic explants of *C. canephora* of 21 dai as shown in Fig 2B. Third, the CM from 7, 14 and 21 days of *C. arabica* was autoclaved and this medium was used to culture the embryogenic explants of 21 dai of *C. canephora*. Fourth, the CM of each flask (50 mL of medium) of *C. arabica* from 7, 14, 21 and

28 dai were fractionated through a membrane of cut-off 5 kDa (Amicon Ultra-15), and the obtained <5 kDa fractions of CM of *C. arabica* (LmmCM) were lyophilized and resuspended with 5 mL of water and sterilized by filtration with a 0.22- μm membrane. This solution was added into the culture medium of *C. canephora* at 21 dai and *D. carota* at the moment of embryogenic induction. *C. canephora* and *D. carota* cultured at induction conditions without the CM medium were used as controls and the biological response for each species was evaluated at 35 days and at 14 dai, respectively. The number of somatic embryos of *D. carota* was determined from three aliquots of 0.5 mL of culture for each flask.

Analytical procedure for the metabolite profiling of LmmCM from *C. arabica* by UPLC-ESI-MS

Secondary metabolites were extracted from 400 mL of CM, 7 dai of SE in *C. arabica*. In brief, the culture medium was lyophilized until the volume reached 50 mL and then extracted three times with ethyl acetate. The extract was reduced to one mL and stored at -20°C prior to analysis. All chemicals were of analytical reagent grade (Sigma-Aldrich). HPLC-grade acetonitrile, ethanol (Fisher Scientific) and deionized water (18.2 M Ω cm, Labconco, USA) were used throughout. Formic acid, ammonium formate and phenolic compounds used as standards were Sigma reagents. Metabolite profiling was performed as described elsewhere [68], using an UltiMate 3000 liquid chromatography (Dionex, Thermo Scientific) UHPLC system equipment with a chromatographic column Luna C18 (150 x 2 mm, 3 μm) from Phenomenex and coupled with mass spectrometry detection (an ion-trap mass spectrometer AmaZon SL fitted with ESI source; Bruker Daltonics). The LC-MS system was controlled by Hystar V3.2 software, where the data were processed by Data Analysis V4.1 SP2 and QuantAnalysis V2.0 SP2 (Bruker Daltonics). The mixed standard solutions of the 34 phenolics compounds (S1 Table) containing 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20 mg.L $^{-1}$ of each compound were prepared in ethanol. All solutions were filtered, the injection volume was 10–30 μL and three replicates were always carried out. Gradient elution with two mobile phases (A—ammonium formate 10 mM + 0.2% v/v formic acid, pH 2.9; B—acetonitrile + 0.2% v/v formic acid) was as follows: 0–1 min 15% B; 1–6 min 50% B; 6–8 min 60% B; 8–11 min 60% B; 11–13 min 90% B; 14–17 min 15% B; column thermostat was set at 30°C and a total flow rate 0.2 mL min $^{-1}$ was applied. The ESI source was operated in negative ionization mode for the compounds 1–32 and in positive ionization mode for compounds 27, 33, and 34, with the following parameters: alternate spray voltage 4,500 V; plate voltage 500 V; nebulizer gas pressure 26 psi (N $_2$); dry gas 6 L min $^{-1}$ (N $_2$); source temperature 200°C and capillary exit voltage 140 V. The mass spectra were obtained by means of an UltraScan mode in the m/z scan range 70–400, with an ion charge control (ICC) target setting 100,000 and a maximum accumulation time 100 ms. Tuning was performed for the mixed standard solution of all 34 compounds (0.1 mg L $^{-1}$ each) using smart parameter setting (SPS); target m/z 200, compound stability 100%, trap drive level 100%. Total ion chromatograms were acquired; base peak and extracted ion chromatograms were generated (m/z window for EIC \pm 0.3 Da). For quantification, Bruker QuantAnalysis software was used, calculating the areas under the $[\text{M}-\text{H}]^{-1}$ ions ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$ for positive ESI mode) from respective EIC. External calibration was carried out using a series of mixed standard solutions and the linear quadratic regression fit yielded $r^2 > 0.999$ (S1 Table); on-column detection limits evaluated based on signal-to-noise ratio 3:1 were in the range 1–22 ng (10–220 $\mu\text{g L}^{-1}$ as referred to the injected solution). The two samples were dissolved in 1 mL deionized water, the results presented in Table 1 correspond to the concentrations found in these solutions.

4-hydroxybenzyl alcohol and phenolic compounds assays on *C. canephora* somatic embryogenesis

Embryogenic cultures of *C. canephora* were treated with 4-hydroxybenzyl alcohol (Sigma, H20806) and phenolic compounds: hydroxybenzoic acid (Sigma, H6761), trans-cinnamic acid (Sigma, C6004), caffeine (Sigma, C0750) and chlorogenic acid (Sigma, C3878). Chlorogenic acid was dissolved in dimethyl sulfoxide (Sigma, D4540), while the other compounds were dissolved in the same induction medium. Then, the solutions were filter-sterilized through a membrane of 0.22 μm . 4HBA was added to the medium at the beginning of SE induction (seven dai) at concentrations of 10^{-6} M and 10^{-4} M and at 14 dai at a concentration of 10^{-4} M. Hydroxybenzoic acid, trans-cinnamic acid, caffeine and chlorogenic acid were added to the medium at seven dai at concentrations of 1, 10, 100 and 1,000 μM , and the total number of somatic embryos in every developmental stage was counted at 56 dai.

DNA methylation

Genomic DNA extraction was carried out according to the method described by Echevarría-Machado et al. [69]. Briefly, 100 mg of leaf explants of *C. arabica* and *C. canephora* under embryogenic conditions, as shown in Fig 2, were collected every seven days from 0 to 49 days. The DNA digestion and the separation of nucleosides were performed as described in detail elsewhere [70], and the HPLC analysis was performed using the chromatographic column Kromasil C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm from Phenomenex), and an Agilent series 1200 HPLC equipped with a pump quaternary and diode array detector. 5mdC quantification was obtained by applying the formula below to the peak areas: % 5mdC = $C\ 5\text{mdC}/[C\ 5\text{mdC} + C\text{dC}] \times 100$, where C is the concentration of 5mdC and 2'-deoxycytosine (dC).

Effects of LmmCM and 5-azacytidine on DNA methylation during the somatic embryogenesis of *C. canephora*

Embryogenic cultures of *C. canephora* were treated in the absence (control) or presence of 10 μM of 5-AzaC added every seven days from day 7 to day 49, whereas the addition of the LmmCM was done only one time, at day 7 after the induction. Then, the explants from the control and each treatment (5-AzaC and LmmCM) were re-collected at 14, 21 and 56 dai for DNA methylation analysis. An assessment of the global DNA methylation levels under the effects of either 5-AzaC or LmmCM was performed as described above.

Statistical analysis

All the data were processed and analyzed using analysis of variance (ANOVA). The significance grade among the mean values was carried out using the Tukey test. Differences were considered to be significant at $P \leq 0.01$. Data were analyzed using Origin V8 software (Data Analysis and Graphing Software).

Supporting Information

S1 Fig. Comparative effect of the LmmCM and the total molecules extracted with ethyl acetate from the conditioned medium (CM) of *Coffea arabica* on the embryogenic cultures of *Daucus carota*. A. Schematic representation of the experimental procedure. CM of *C. arabica* was separated and extracted as described in Materials and Methods. The two different fractions: the low molecular mass of conditioned medium (LmmCM) and the ethyl acetate phase were added separately to the embryogenic cultures of *Daucus carota*. B. Effects of LmmCM

and ethyl acetate phase in the somatic embryogenesis process of *D. carota*. (TIF)

S2 Fig. Gas chromatography profiles of compounds extracted from the conditioned medium of 7-day-old *C. arabica* culture. A. Extraction of the LmmCM fraction with ethyl acetate. Peaks marked as 1, 2 and 3 correspond to the fragmentation patterns of trans-cinnamic acid (B), hydroxybenzoic acid (C) and caffeine (D), respectively. (TIF)

S3 Fig. Gas chromatography profile of the phenolic compounds extracted with ethyl acetate at day 7 from conditioned medium of *Coffea arabica*. Each peak was identified by mass spectroscopy as shown in [S1 Fig](#). A chromatogram of a standard sample of 4-hydroxymethyl alcohol was overlapped on the chromatogram of the ethyl acetate extracted conditioned medium in order to show the retention time of this compound and its absence in the analyzed sample. (TIF)

S4 Fig. Effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on the embryogenic cultures of *Coffea canephora*. A. *4HBA at 10^{-6} M and 10^{-4} M was added at the beginning (7 days) of the embryogenic induction of *C. canephora*. **4HBA at 10^{-4} M was added at 14 days after embryogenic induction of *C. canephora*. B. The number of embryos at different developmental stages was counted at 56 days. The control was cultivated in the absence of 4HBA. Error bars represent the SE ($n = 3$). Different letters in bars represent the statistical significance of mean differences between each embryogenic stage at a given time by the Tukey test ($P \leq 0.01$). The experiment was carried out three times. (TIF)

S1 Table. Analytical parameters and detection limits (DL) evaluated for 34 phenolic compounds based on linear regression calibration and concentration determined in LmmCM samples from *C. arabica* by UPLC-ESI-ITMS. (DOCX)

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Science and Technology (157014 to VMLV, 178149 to CDLP). GINC was supported by a scholarship (213451) from the National Council for Science and Technology. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VMLV CDLP. Performed the experiments: GINC AAM KW RMGA. Analyzed the data: VMLV CDLP GINC KW. Contributed reagents/materials/analysis tools: VMLV CDLP KW. Wrote the paper: VMLV CDLP GINC.

References

1. Zimmerman JL. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*. 1993; 5: 1411–1423. doi: [10.1105/tpc.5.10.1411](https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1411) PMID: [12271037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12271037/)
2. Loyola-Vargas VM, De-la-Peña C, Galaz-Avalos RM, Quiroz-Figueroa FR. Plant tissue culture. An intemporal set of tools. In: Walker JM, Rapley R, editors. *Protein and Cell Biotechnology Handbook*. Totowa: Humana Press; 2008. pp. 875–904. doi: [10.1007/978-1-60327-375-6_50](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_50)
3. Vogel G. How does a single somatic cell become a whole plant? *Science*. 2005; 309: 86. doi: [10.1126/science.309.5731.86](https://doi.org/10.1126/science.309.5731.86) PMID: [15994532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15994532/)

4. Fuentes-Cerda CFJ, Monforte-González M, Méndez-Zeel M, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnol Lett*. 2001; 23: 1341–1343. doi: [10.1023/A:1010545818671](https://doi.org/10.1023/A:1010545818671)
5. Quiroz-Figueroa FR, Méndez-Zeel M, Larqué-Saavedra A, Loyola-Vargas VM. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep*. 2001; 20: 679–684. doi: [10.1007/s002990100386](https://doi.org/10.1007/s002990100386)
6. De-la-Peña C, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM. Possible role of light and benzylaminopurine on biosynthesis of polyamines during the somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Mol Biotechnol*. 2008; 39: 215–224. doi: [10.1007/s12033-008-9037-8](https://doi.org/10.1007/s12033-008-9037-8) PMID: [18228163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18228163/)
7. De Vries SC, Booij H, Janssens R, Vogels R, Saris L, Loschiavo F. et al. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev*. 1988; 2: 462–476.
8. De Jong AJ, Cordewener J, LoSchiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A. et al. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. 1992; 4: 425–433. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.4.4.425> PMID: [1498601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1498601/)
9. Kreuger M, Van Holst GJ. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*. 1993; 189: 243–248. doi: [10.1007/BF00195083](https://doi.org/10.1007/BF00195083)
10. Matthys-Rochon E. Fascinating questions raised by the embryonic development in plants. *Biologia*. 2002; 57: 1–4.
11. De Jong AJ, Heidstra R, Spaink HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T. et al. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell*. 1993; 5: 615–620. doi: [10.1105/tpc.5.6.615](https://doi.org/10.1105/tpc.5.6.615) PMID: [12271077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12271077/)
12. Kobayashi T, Higashi K, Kamada H. 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in suspension-cell cultures and inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Physiol Plant*. 2001; 112: 280–284. doi: [10.1034/j.1399-3054.2001.1120217.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120217.x) PMID: [11454234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11454234/)
13. Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol*. 2003; 44: 1412–1416. doi: [10.1093/pcp/pcg161](https://doi.org/10.1093/pcp/pcg161) PMID: [14701937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14701937/)
14. Higashi K, Daita M, Kobayashi T, Sasaki K, Harada H, Kamada H. Inhibitory conditioning for carrot somatic embryogenesis in high-cell-density cultures. *Plant Cell Rep*. 1998; 18: 2–6. doi: [10.1007/s002990050522](https://doi.org/10.1007/s002990050522)
15. Kobayashi T, Higashi K, Sasaki K, Asami T, Yoshida S, Kamada H. Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Physiol*. 2000; 41: 268–273. doi: [10.1093/pcp/41.3.268](https://doi.org/10.1093/pcp/41.3.268) PMID: [10805589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10805589/)
16. Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Kamada H. Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of Japanese Larch (*Larix leptolepis* GORDON). *Plant Biotechnol*. 2004; 21: 87–94. <http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.87>.
17. Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Koshino H, Asami T, Fujioka S et al. Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Cell Physiol*. 2005; 46: 445–453. doi: [10.1093/pcp/pci041](https://doi.org/10.1093/pcp/pci041) PMID: [15695457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15695457/)
18. Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Koshino H, Nakamura T, Asami T et al. Identification of a factor that complementarily inhibits somatic embryogenesis with vanillyl benzyl ether. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2007; 43: 203–208. doi: [10.1007/s11627-006-9016-3](https://doi.org/10.1007/s11627-006-9016-3) PMID: [17763919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17763919/)
19. Fini L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchkiss E et al. Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr*. 2007; 137: 2622–2628. PMID: [18029474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18029474/)
20. Fu C, Li L, Wu W, Li M, Yu X, Yu L. Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture. *Plant Cell Rep*. 2012; 31: 1321–1331. doi: [10.1007/s00299-012-1251-y](https://doi.org/10.1007/s00299-012-1251-y) PMID: [22562779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22562779/)
21. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 269–277. doi: [10.1093/carcin/bgi206](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi206) PMID: [16081510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16081510/)
22. Schneider-Stock R, Ghantus A, Bajbouj K, Saikali M, Darwiche N. Epigenetic mechanisms of plant-derived anticancer drugs. *Front Biosci*. 2012; 17: 129–173. doi: [10.2741/3919](https://doi.org/10.2741/3919) PMID: [22201736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22201736/)
23. LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*. 1989; 77: 325–331. doi: [10.1007/BF00305823](https://doi.org/10.1007/BF00305823) PMID: [24232608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232608/)

24. Lejjak-Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S, Jelaska S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J Plant Physiol*. 2004; 161: 229–236. doi: [10.1078/0176-1617-01055](https://doi.org/10.1078/0176-1617-01055) PMID: [15022838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15022838/)
25. Viejo M, Rodríguez R, Valledor L, Pérez M, Cañal M, Hasbún R. DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sex Plant Reprod*. 2010; 23: 315–323. doi: [10.1007/s00497-010-0145-9](https://doi.org/10.1007/s00497-010-0145-9) PMID: [20552230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20552230/)
26. Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R et al. New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE*. 2013; 8: e72160. doi: [10.1371/journal.pone.0072160](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072160) PMID: [23977240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23977240/)
27. Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañal J, Salaj J et al. DNA methylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees*. 2009; 23: 1285–1293. doi: [10.1007/s00468-009-0370-8](https://doi.org/10.1007/s00468-009-0370-8)
28. Xu M, Li X, Korban S. DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet*. 2004; 109: 899–910. doi: [10.1007/s00122-004-1717-6](https://doi.org/10.1007/s00122-004-1717-6) PMID: [15221146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15221146/)
29. Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci*. 2003; 165: 61–68. doi: [10.1016/S0168-9452\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00127-4)
30. Santos D, Feveireiro P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2002; 70: 155–161. doi: [10.1023/A:1016369921067](https://doi.org/10.1023/A:1016369921067)
31. Yamamoto N, Kobayashi H, Togashi T, Mori Y, Kikuchi K, Kuriyama K et al. Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *J Plant Physiol*. 2005; 162: 47–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.013>. PMID: [15700420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15700420/)
32. Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Riguezza M, Delmotte F, Brignolas F et al. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiol Biochem*. 2005; 43: 681–691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.011>. PMID: [16046142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16046142/)
33. Söndahl MR, Sharp WR. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z Pflanzenphysiol*. 1977; 81: 395–408.
34. Yasuda T, Fujii Y, Yamaguchi T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol*. 1985; 26: 595–597.
35. Michaux-Ferrière N, Dublin P. Embryogenèse somatique chez *Coffea arabica* induction et développement des cellules embryogènes. 12^e Colloque Scientifique Internationale sur le Café. Paris. 1987;418–425.
36. Papanastasiou I, Soukoulis K, Moschopoulou G, Kahia J, Kintzios S. Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea arabica* L.) callus cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2008; 92: 215–225. doi: [10.1007/s11240-007-9326-0](https://doi.org/10.1007/s11240-007-9326-0)
37. Quiroz-Figueroa FR, Monforte-González M, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM. Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota FA, editors. *Plant cell culture protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2006. pp. 111–117. doi: [10.1385/1-59259-959-1:111](https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:111)
38. Matthys-Rochon E. Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2005; 47: 23–29.
39. Umehara M, Ikeda M, Kamada H. Endogenous factors that regulate plant embryogenesis: recent advances. *Jap J Plant Science*. 2007; 1: 1–6.
40. Xiao W, Custard K, Brown R, Lemmon B, Harada J, Goldberg RB et al. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*. 2006; 18: 805–814. doi: [10.1105/tpc.105.038836](https://doi.org/10.1105/tpc.105.038836) PMID: [16531498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16531498/)
41. Levanic DL, Mihaljevic S, Jelaska S. Variations in DNA methylation in *Picea Omorika* (Panc) Purk. embryogenic tissue and the ability for embryo maturation. *Prop Orn Plants*. 2009; 9: 3–9.
42. Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U et al. The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*. 2001; 127: 803–816. doi: [10.1104/pp.010324](https://doi.org/10.1104/pp.010324) PMID: [11706164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11706164/)
43. Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 2002; 14: 1737–1749. doi: [10.1105/tpc.001941](https://doi.org/10.1105/tpc.001941) PMID: [12172019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172019/)
44. Rojas-Herrera R, Quiroz-Figueroa FR, Sánchez-Teyer F, Loyola-Vargas VM. Molecular analysis of somatic embryogenesis: An overview. *Physiol Mol Biol Plants*. 2002; 8: 171–184.

45. Ikeda M, Umehara M, Kamada H Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. *Plant Biotechnol.* 2006; 23: 153–161. <http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.153>.
46. Yang X, Zhang X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci.* 2010; 29: 36–57. doi: [10.1080/07352680903436291](https://doi.org/10.1080/07352680903436291)
47. Fehér A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol Szeged.* 2008; 52: 53–56.
48. Kobayashi T, Higashi K, Kamada H Stimulatory and inhibitory conditioning factors that regulate cell proliferation and morphogenesis in plant cell cultures. *Plant Biotechnol.* 2001; 18: 93–99. <http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.93>.
49. Kouakou TH, Waffo-Tégou P, Kouadio YJ, Valls J, Richard T, Decendit A et al. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2007; 90: 25–29. doi: [10.1007/s11240-007-9243-2](https://doi.org/10.1007/s11240-007-9243-2)
50. Friedman J, Waller G. Caffeine hazards and their prevention in germinates seed of coffee (*Coffea arabica* L.). *J Chem Ecol.* 1983; 9: 1099–1106. doi: [10.1007/BF00982214](https://doi.org/10.1007/BF00982214) PMID: [24407803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24407803/)
51. Hernández P, Mingo R, González A, López-Sáez J Relationship of chromosomal damage induced by caffeine to growth temperature and ATP level in proliferating cells. *Mut Res.* 1986; 164: 327–333. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(86\)90003-8](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(86)90003-8).
52. Verma DPS. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001; 52: 751–784. doi: [10.1146/annurev.arplant.52.1.751](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.751) PMID: [11337415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11337415/)
53. Valster AH, Hepler PK. Caffeine inhibition of cytokinesis: effect on the phragmoplast cytoskeleton in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Protoplasma.* 1997; 196: 155–166. doi: [10.1007/BF01279564](https://doi.org/10.1007/BF01279564)
54. Hepler PK, Bonsignore C. Caffeine inhibition of cytokinesis: ultrastructure of cell plate formation/degradation. *Protoplasma.* 1990; 157: 182–192. doi: [10.1007/BF01322651](https://doi.org/10.1007/BF01322651)
55. Möslí WS, Baumann TW. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry.* 1996; 42: 985–996. doi: [10.1016/0031-9422\(96\)00072-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00072-6)
56. Aerts RJ, Baumann TW. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *J Exp Bot.* 1994; 45: 497–503. doi: [10.1093/jxb/45/3/497](https://doi.org/10.1093/jxb/45/3/497) PMID: [126490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/126490/)
57. Fridborg G, Pedersen M, Landstrom L-E, Eriksson T. The effect of activated charcoal on tissue cultures; adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol Plant.* 1978; 43: 104–106. doi: [10.1111/j.1399-3054.1978.tb01575.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01575.x)
58. Liu C, Xu Z-H, Chua N-H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell.* 1993; 5: 621–630. doi: [10.1105/tpc.5.6.621](https://doi.org/10.1105/tpc.5.6.621) PMID: [12271078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12271078/)
59. Petrásek J, Friml J. Auxin transport routes in plant development. *Development.* 2009; 136: 2675–2688. doi: [10.1242/dev.030353](https://doi.org/10.1242/dev.030353) PMID: [19633168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633168/)
60. Mounir EB, Ismail EH. Characterization of two non constitutive hydroxycinnamic acid derivatives in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus in relation with tissue browning. *Biotechnology.* 2004; 3: 155–159. PMID: [15292581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292581/)
61. Cvikrová M, Malá J, Hrubcová M, Eder J, Zón J, Macháčková I. Effect of inhibition of biosynthesis of phenylpropanoids on sessile oak somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem.* 2003; 41: 251–259. [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00016-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00016-0).
62. Santiago R, de Armas R, Fontaniella B, Vicente C, Legaz M. Changes in soluble and cell wall-bound hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. *Eur J Plant Pathol.* 2009; 124: 439–450. doi: [10.1007/s10658-009-9431-5](https://doi.org/10.1007/s10658-009-9431-5)
63. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2012; 15: 405–411. doi: [10.1016/j.cmet.2012.01.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.001) PMID: [22405075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22405075/)
64. Crescenti A, Solà R, Valls RM, Caimari A, del Bas JM, Anglés N et al. Cocoa consumption alters the global DNA methylation of peripheral leukocytes in humans with cardiovascular disease risk factors: A randomized controlled trial. *PLoS ONE.* 2013; 8: e65744. doi: [10.1371/journal.pone.0065744](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065744) PMID: [23840361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23840361/)
65. Koshiishi C, Kato A, Yama S, Crozier A, Ashihara H. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS Lett.* 2001; 499: 50–54. PMID: [11418110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11418110/)
66. Murashige T, Skoog F A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962; 15: 473–497. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

67. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 1968; 50: 151–158. doi: [10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5) PMID: [5650857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5650857/)
68. Alcázar Magana A, Wrobel K, Torres Elguera JC, Corrales Escobosa AR, Wrobel K. Determination of small phenolic compounds in tequila by liquid chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Food Anal Method*. 2015; 8: 864–872. doi: [10.1007/s12161-014-9967-7](https://doi.org/10.1007/s12161-014-9967-7)
69. Echevarría-Machado I, Sánchez-Cach L, Hernández-Zepeda C, Rivera-Madrid R, Moreno-Valenzuela O. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Mol Biotechnol*. 2005; 31: 129–135. doi: [10.1385/MB:31:2:129](https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129) PMID: [16170213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16170213/)
70. De-la-Peña C, Nic-Can G, Ojeda G, Herrera-Herrera J, Lopez-Torres A, Wrobel K et al. KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*. 2012; 12: 203. doi: [10.1186/1471-2229-12-203](https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-203) PMID: [23126409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23126409/)

Supporting Information

Table S1 Analytical parameters and detection limits (DL) evaluated for 34 phenolic compounds based on linear regression calibration and concentration determined in LmmCM samples from *C. arabica* by UPLC-ESI-ITMS.

	Phenolic compound	Linear regression	R ²	^a DL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	^b Concentration \pm SD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
					LmmCM ₁	LmmCM ₂
	Negative ESI					
1	Gallic acid	$A = -27283.9 c^2 + 1765301.8 c + 179002.6$	0.99979	2.35	n/d	n/d
2	Homogentisic acid	$A = -14645.8 c^2 + 1816237.2 c - 233561.9$	0.99976	2.66	n/d	n/d
3	Protocatechuic acid	$A = 1142178.8 c - 4719.3$	1.00000	2.56	n/d	n/d
4	3,4-Dihydroxyphenyl-acetic acid	$A = 8277.3 c^2 + 499117.8 c - 114897.3$	0.99986	11.12	n/d	n/d
5	Chlorogenic acid	$A = 3711744.9 c + 959271.1$	0.99914	2.57	2430 \pm 20	5630 \pm 20
6	Catechin	$A = -52723.8 c^2 + 5185403.8c + 221578.8$	0.99997	2.80	40 \pm 1	203 \pm 1
7	Resorcinol	$A = -1264.5 c^2 + 107837.4 c - 3947.3$	1.00000	66.96	n/d	n/d
8	2,5-Dihydroxybenzoic acid	$A = 1703501.0 c - 93884.3$	0.99971	7.79	n/d	n/d
9	4-Hydroxybenzoic acid	$A=308760.4 c + 65975.7$.99970	10.91	n/d	n/d
10	Epicatechin	$A = -37724.6 c^2 + 2866499.0 c + 367154.9$	0.99971	3.22	34 \pm 2	117 \pm 2
11	2,3-Dihydroxybenzoic acid	$A = -34976.7 c^2 + 2567671.5 c + 345695.9$	0.99970	5.83	n/c	n/c
12	Caffeic acid	$A = -29836.4 c^2 + 3511871.2 c + 138126.5$	1.00000	3.00	12.6 \pm 1	57.4 \pm 6
13	Catechol	$A = -2965.1 c^2 + 369842.4 c + 83884.4$	0.99926	17.90	n/d	n/d
14	Vanillic acid	$A = -1257.7 c^2 + 200503.1 c + 7294.1$	0.99998	19.06	n/d	n/d
15	Syringic acid	$A = -2788.9 c^2 + 542130.9 c + 26899.9$	1.00000	10.04	n/d	n/d
16	2,4-Dihydroxybenzoic acid	$A = 2082433.6 c - 76759.2$	0.99998	1.96	n/d	n/d
17	Homovanillic acid	$A = 847717.4 c + 18531.4$	0.99952	8.17	n/d	n/d
18	3-Hydroxybenzoic	$A = 528352.2 c - 102156.8$	0.99982	9.65	n/d	n/d

	acid					
19	4-Hydroxyphenyl-propionic acid	$A = 1585788.1c - 226651.0$	0.99930	2.85	n/d	n/d
20	3,4-Dihydroxyphenyl-propionic acid	$A = -5199.4 c^2 + 441399.8 c + 40767.9$	0.99985	10.32	n/d	n/d
21	2,6-Dihydroxybenzoic acid	$A = 3770099.2 c + 763373.4$	0.99989	2.34	n/d	n/d
22	p-Coumaric acid	$A = 1389312.3 c + 286245.0$	0.99966	4.86	n/d	n/d
23	Synapic acid	$A = -29312.0 c^2 + 3218654.8 c - 131613.5$	0.99997	2.34	n/d	n/d
24	Ferulic acid	$A = 2288514.1 c - 281345.6$	0.99970	1.81	13.9±1	38.7±3
25	3,4-Dimethoxybenzoic acid	$A = 198435.6 c + 13488.1$	0.99995	25.64	n/d	n/d
26	m-Coumaric acid	$A = 3202812.3 c - 175737.6$	0.99991	1.28	n/d	n/d
27	o-Anisic acid	$A = 37200.7 c - 1613.1$	0.99953	75.00	n/d	n/d
28	trans 2-Hydroxy-cinnamic acid	$A = 13254.6 c^2 + 1431783.9 c - 148330.3$	0.99993	2.67	n/d	n/d
29	Salicylic acid	$A = -15144.6 c^2 + 1415660.7 c + 184253.4$	0.99987	9.24	103±13	304±30
30	Benzoic acid	$A = 31316.8 c + 8467.8$	0.99945	56.39	127±5	384±29
31	Cinnamic acid	$A = 183553.74 c + 18898.1$	0.99997	27.99	n/d	n/d
32	4-Methoxycinnamic acid	$A = 8764.1 c^2 + 51311.4 c + 12265.3$	1.00000	24.92	n/d	n/d
Positive ESI						
27	o-Anisic acid	$A = -549347.2 c^2 + 29698308.2 c + 4659249.8$	0.99926	4.29	n/d	n/d
33	Caffeine	$A = -952624.7 c^2 + 59372240.1 c + 8283206.7$	0.99950	5.54	8574±57	17045±68
34	Coumarin	$A = 23993432.2 c + 4553923.3$	0.99901	27.99	n/d	n/d

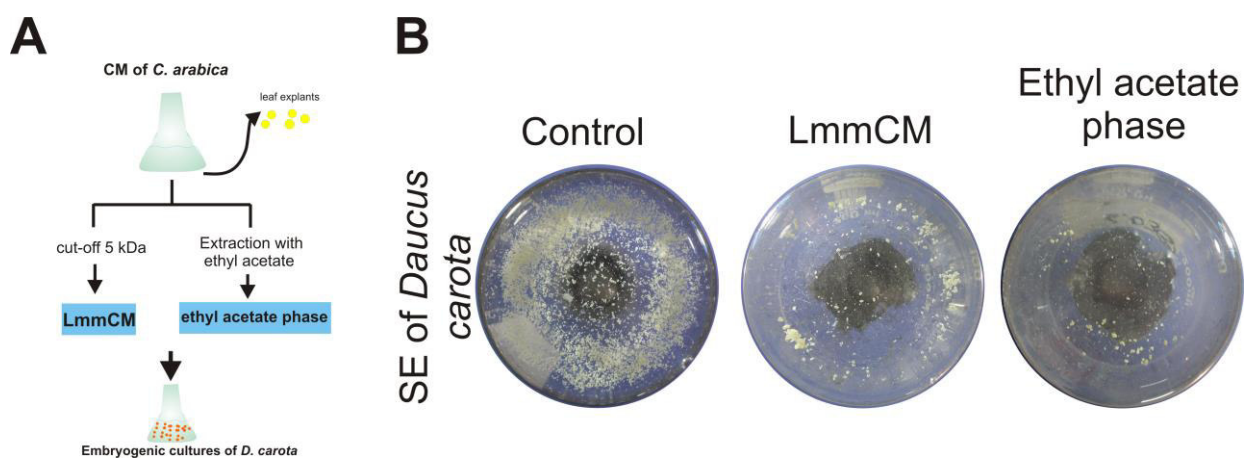
^a Calibration detection limit evaluated as signal-to-noise ratio 3:1

^b Standard deviation evaluated based on three successive injections of the LmmCM sampl

S1 Fig

Comparative effect of the LmmCM and the total molecules extracted with ethyl acetate from the conditioned medium (CM) of *Coffea arabica* on the embryogenic cultures of *Daucus carota*.

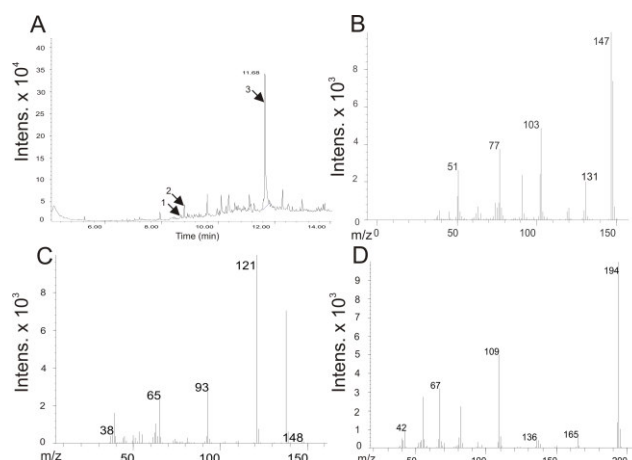
A. Schematic representation of the experimental procedure. CM of *C. arabica* was separated and extracted as described in Materials and Methods. The two different fractions: the low molecular mass of conditioned medium (LmmCM) and the ethyl acetate phase were added separately to the embryogenic cultures of *Daucus carota*. B. Effects of LmmCM and ethyl acetate phase in the somatic embryogenesis process of *D. carota*.



S2 Fig

Gas chromatography profiles of compounds extracted from the conditioned medium of 7-day-old *C. arabica* culture.

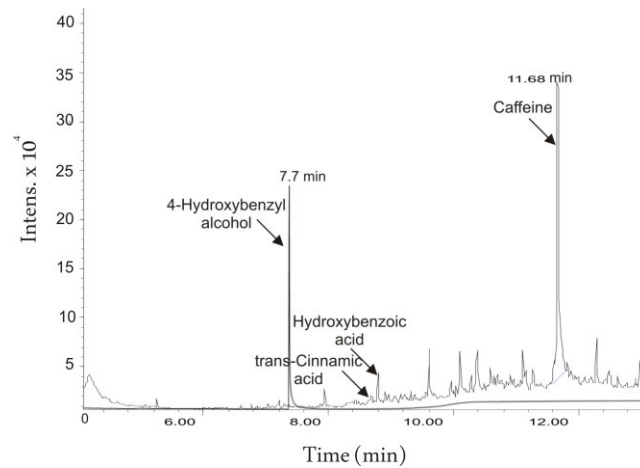
A. Extraction of the LmmCM fraction with ethyl acetate. Peaks marked as 1, 2 and 3 correspond to the fragmentation patterns of trans-cinnamic acid (B), hydroxybenzoic acid (C) and caffeine (D), respectively.



S3 Fig

Gas chromatography profile of the phenolic compounds extracted with ethyl acetate at day 7 from conditioned medium of *Coffea arabica*.

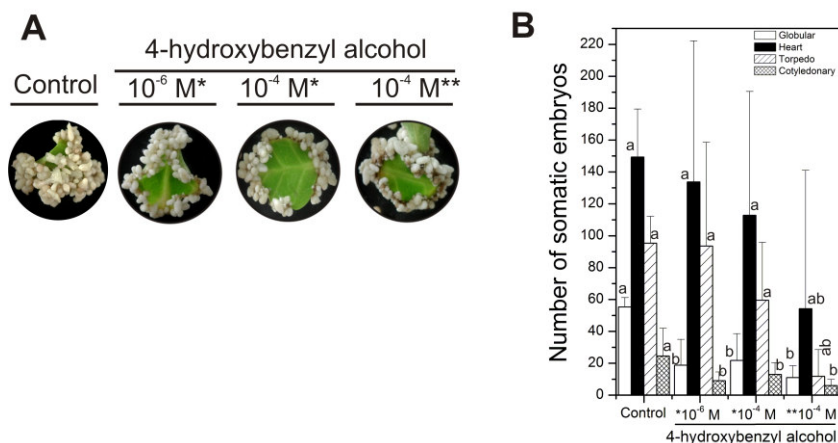
Each peak was identified by mass spectroscopy as shown in [S1 Fig](#). A chromatogram of a standard sample of 4-hydroxymethyl alcohol was overlapped on the chromatogram of the ethyl acetate extracted conditioned medium in order to show the retention time of this compound and its absence in the analyzed sample.



S4 Fig

Effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on the embryogenic cultures of *Coffea canephora*.

A. *4HBA at 10^{-6} M and 10^{-4} M was added at the beginning (7 days) of the embryogenic induction of *C. canephora*. **4HBA at 10^{-4} M was added at 14 days after embryogenic induction of *C. canephora*. B. The number of embryos at different developmental stages was counted at 56 days. The control was cultivated in the absence of 4HBA. Error bars represent the SE ($n = 3$). Different letters in bars represent the statistical significance of mean differences between each embryogenic stage at a given time by the Tukey test ($P \leq 0.01$). The experiment was carried out three times.



Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection

Armando Alcazar Magana · Kazimierz Wrobel ·
Julio Cesar Torres Elguera ·
Alma Rosa Corrales Escobosa · Katarzyna Wrobel

Received: 29 April 2014 / Accepted: 8 August 2014 / Published online: 19 August 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Tequila is elaborated from *Agave tequilana* Weber blue variety and it is commercialized at different stages of aging. Chemical composition of this product has often been addressed; however, data on phenolic compounds are scarce. In this work, a high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–ion trap mass spectrometry (HPLC–ESI–ITMS) procedure has been established for the determination of 34 small phenolic compounds. The combination of suitable separation conditions with extraction of chromatograms at individual m/z values has enabled for total analysis run of 17 min (11 min separation plus 6 min column cleaning/equilibration) with the detection limits in the range 1.28–75.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ (0.07–6.1 pmol on-column). Commercial tequilas analyzed included 6 white, 12 rested, and 4 aged. The following acids were found and quantified: gallic, procatechuic, 4-hydroxybenzoic, vanillic, syringic, homovanillic, 3-hydroxybenzoic, ferulic, salicylic, and benzoic. The white tequilas contained fewer compounds and lower total phenolics concentrations (range 36–408 $\mu\text{g l}^{-1}$) as compared to the rested and aged liquors (515–4,296 and 2,048–3,249 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively). In the latter products, syringic, vanillic, procatechuic, and gallic acids were the most abundant, which indicates that maturation in wooden barrels is the main source of small phenolics in tequila. On the other part, homovanillic acid was found in all tequila types (medians for white, rested, and aged products 82, 153, and 162 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively),

suggesting that some phenolics may originate from the raw material or might be formed during liquor elaboration.

Keywords Phenolic compounds · Tequila · Liquid chromatography · Mass spectrometry

Introduction

Among many culinary, medicinal, and industrial applications of plants from *Agavaceae* family, the utilization of *Agave tequilana* Weber blue variety as a raw material for tequila elaboration has received major attention. The industrial process is regulated by the Mexican official norm NOM-006-SCFI-1994. In brief, agave heads are first cooked for hydrolysis of polysaccharides (mainly inulin), then sugars are extracted and microorganisms are added for ethanol fermentation. The fermented wort is distilled yielding white tequila; whereas to obtain rested and aged tequilas, the liquor is stored in white oak barrels for the time periods of 2 and 12 months, respectively (longer time for high-quality aged tequila). Finally, the liquor is filtered and bottled (Santos-Zea et al. 2012). In several studies, chemical composition of tequila has been addressed with an emphasis on the quality control, authentication, discrimination between 100 % and mixed tequila, adulteration, or possible improvement of the elaboration process. In this sense, the determination of volatile compounds, aldehydes, alcohols, organic acids, furanic compounds, terpenes, inorganic anions, and metals/metalloids has been reported (Vallejo-Cordoba et al. 2004; Muñoz Rodriguez et al. 2005; Prado-Ramirez et al. 2005; Lachenmeier et al. 2006; Pena-Alvarez et al. 2006; Carreon-Alvarez et al. 2008; Rodriguez Flores et al. 2009); nonetheless, analytical data on phenolic compounds are scarce (Munoz-Munoz et al. 2008).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12161-014-9967-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. A. Magana · K. Wrobel · J. C. T. Elguera · A. R. C. Escobosa ·
K. Wrobel (✉)
Chemistry Department, University of Guanajuato,
36000 Guanajuato, Mexico
e-mail: katarzyn@ugto.mx

The importance of plant phenolics is mainly due to their antioxidant and biological activity; moreover, these compounds usually contribute in pleasant organoleptic characteristics of food and beverages (Dai and Mumper 2010; Khadem and Marles 2010; Martins et al. 2011). Small phenolic compounds in plants are usually conjugated with organic acids, glycans, or embedded in polymeric structures. There is also a fraction of free phenolics, and these compounds can be cleavage from larger structures upon chemical or enzymatic treatment.

Different groups of phenolic compounds such as flavonoids, tannins, saponins, or lignins have been reported in plants of agave genus (Ben Hamissa et al. 2012; Santos-Zea et al. 2012; Ahumada-Santos et al. 2013; Almaraz-Abarca et al. 2013); in *A. tequilana*, the only phenolic compounds studied were homoisoflavanones (Morales-Serna et al. 2010).

The original profile of agave phenolic compounds is certainly modified during tequila elaboration; in a course of thermal, chemical, and microbiological treatment and during distillation, large structures can be degraded yielding free phenolics, some compounds can be lost, or their chemical structure can be altered (Nogueira et al. 2008; Santos-Zea et al. 2012). On the other hand, an important source of small phenolics in tequila is its maturation in wooden barrels (Ávila-Reyes et al. 2010; Cerezo et al. 2010; Madrera et al. 2010). In this regard, gallic, procatechuic, vanillic, syringic, and ferulic acids have been studied as potential aging markers (Munoz-Munoz et al. 2008).

In typical approach, analysis of phenolic compounds in plant-derived samples is carried out by liquid chromatography with spectrophotometric, fluorimetric, or mass spectrometry detection. Even though mass spectrometry tools have gained importance in this field, the great majority of recent studies used high-resolution detectors and/or MS/MS fragmentation for identification/confirmation of individual compounds, whereas diode array spectrophotometric detection (DAD) was preferentially used for quantification of small phenolic acids (Nixdorf and Hermosin-Gutierrez 2010; Hafeez Laghari et al. 2011; Liu et al. 2012; Sanz et al. 2012; Bai et al. 2013; Luo et al. 2013; Wu et al. 2013). Unlike DAD, where as long as 80 min chromatographic runs are necessary (Sun et al. 2007; Khanam et al. 2012; Sanz et al. 2012), high selectivity of MS detection compensates for incomplete resolution and separation time is usually much shorter (Labronici Bertin et al. 2014). For quantification purposes, single ion monitoring (SIM), extraction ion chromatograms (EIC) in MS detection or selective reaction monitoring (SRM), and multiple reaction monitoring (MRM) in MSⁿ are particularly well suited (Gratacós-Cubarsí et al. 2010; Sentandreu et al. 2013; Labronici Bertin et al. 2014).

As already mentioned before, only five small phenolic compounds were determined in tequila so far (Munoz-Munoz et al. 2008). Taking into consideration the different potential

sources of phenolics and their possible transformations during liquor elaboration or maturation, the intent of this work was to establish a simple, high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (HPLC–ESI-ITMS) procedure for the determination of a larger amount of compounds at sub-parts per million levels and with minimum sample treatment. In particular, 34 compounds often reported in the analysis of plants and plant-derived products were included. The results obtained indicate that the main source of small phenolics in these liquors is their maturation in wooden barrels; however, some compounds might originate from the raw material or could be formed during the elaboration process.

Materials and Methods

Instrumentation

An UltiMate 3000 liquid chromatograph (Dionex, Thermo Scientific) equipped with a binary pump, a degasser, a thermostated column compartment, and an autosampler was on-line coupled to an ion-trap mass spectrometer AmaZon SL fitted with ESI source (Bruker Daltonics). The LC–MS system was controlled by Hystar V3.2 where the data have been processed by Data Analysis V4.1 SP2 and QuantAnalysis V2.0 SP2 (Bruker Daltonics). The chromatographic column was Luna C18 (150×2 mm, 3 μm) from Phenomenex.

Reagents and Samples

All chemicals were of analytical reagent grade (Sigma-Aldrich). HPLC-grade acetonitrile, ethanol (Fisher Scientific), and deionized water (18.2 MΩ cm⁻¹, Labconco, USA) were used throughout. Formic acid and ammonium formate were Sigma reagents.

The following phenolic compounds (Sigma) were used: gallic acid (1); homogentisic acid (2); procatechuic acid (3); 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-DHPAA (4); chlorogenic acid (5); catechin (6); resorcinol (7); 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,5-DHBA (8); 4-hydroxybenzoic acid, 4-HBA (9); epicatechin (10); 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA (11); caffeic acid (12); catechol (13); vanillic acid (14); syringic acid (15); 2,4-dihydroxybenzoic acid, 2,4-DHBA (16); homovanillic acid (17); 3-hydroxybenzoic acid, 3-HBA (18); 4-hydroxyphenylpropionic acid, 4-HPPA (19); 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid, 3,4-DHPPA (20); 2,6-dihydroxybenzoic, 2,6-DHBA (21); *p*-coumaric acid (22); synapic acid (23); ferulic acid (24); 3,4-dimethoxybenzoic acid, 3,4-DMBA (25); *m*-coumaric acid (26); *o*-anisic acid (27); *trans*-2-hydroxycinnamic acid (28); salicylic acid (29); benzoic acid (30); cinnamic acid (31); 4-methoxycinnamic acid (32) caffeine (33); and coumarin (34). Molecular

structures are presented systematically in Electronic Supplementary Material (Table 1S).

Different brands of commercial 100 % tequila from the companies renowned in Mexico (all of them localized in Jalisco and Guanajuato states) were purchased in the local stores. In total, 22 tequilas were analyzed and these included 6 white (B1–B6), 12 rested (R1–R12), and 4 aged tequilas (A1–A4).

Analytical Procedure

For calibration, the mixed standard solutions containing 0; 0.05; 0.10; 0.50; 1.0; 2.0; and 2.5 mg l⁻¹ of each compound were prepared in 40 % v/v ethanol and tequila samples were 1:3 diluted with the mobile phase A. For recovery experiments, 1.0 ml of standard mix containing 0.45 mg l⁻¹ of each compound was added to 1.0 ml of the rested tequila R2 and the volume was brought to 3.0 ml with mobile phase A (0.15 mg l⁻¹ of each compound in undiluted sample). All solutions were filtered (0.22- μ m PVDF Whatman filters), the injection volume was 10 μ l and three replicates were always carried out. Gradient elution with two mobile phases (A, ammonium formate 10 mM+0.2 % v/v formic acid, pH 2.9; B, acetonitrile+0.2 % v/v formic acid) was as follows: 0–1 min 15 % B, 1–6 min 50 % B, 6–8 min 60 % B, 8–11 min 60 % B, 11–13 min 90 % B, and 14–17 min 15 % B; column thermostat was set at 30 °C and a total flow rate 0.25 ml min⁻¹ was applied.

The ESI source was operated in negative ionization mode for the compounds 1–32 and in positive ionization mode for compounds 27, 33, and 34, with the following parameters: alternate spray voltage 4,500 V; plate voltage 500 V; nebulizer gas pressure 26 psi (N₂); dry gas 6 l min⁻¹ (N₂); source temperature 200 °C, and capillary exit voltage 140 V. The mass spectra were obtained by means of an UltraScan mode in the *m/z* scan range 70–400, with an ion charge control (ICC) target setting 100,000 and a maximum accumulation time 100 ms. Tuning was performed for the mixed standard solution of all 34 compounds (0.1 mg l⁻¹ each) using smart parameter setting (SPS); target *m/z* 200, compound stability 100 %, and trap drive level 100 %. Total ion chromatograms were acquired; base peak and extracted ion chromatograms were generated (*m/z* window for EIC \pm 0.3 Da). For quantification, Bruker Quant Analysis software was used, calculating the areas under the [M-H]⁻ ions ([M+H]⁺ for positive ESI mode) from respective EIC.

Statistical Methods

The results presented are means obtained for three replicates, standard deviations and median values were calculated using Microsoft Excel 2010. Statistical unpaired *t* test for independent samples was used to compare the mean values of

variables measured in the rested and aged tequilas. Significance level was established at *p*<0.05. The software used was Statistica for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

Results and Discussion

Method Development

The molecular mass values of the 34 phenolics included in this work are in the range 110–354 Da, and some of them present this same nominal mass; such is the case of MM=110 Da for resorcinol (7) and catechol (13); 138 Da for isomers of hydroxybenzoic acid (9, 18, 29); 154 Da for procatechuic acid (3) and isomers of dihydroxybenzoic acid (8, 11, 16, 21); 164 Da for *p*-coumaric acid (22), *m*-coumaric acid (26), and *trans*-2-hydroxycinnamic acid (28); 168 Da for homogentisic acid (2), 3,4-DHPAA (4), and vanillic acid (14); 182 Da for homovanillic acid (17), 3,4-DHPPA (20), and 3,4-DMBA (25); and 290 Da for catechin (6) and epicatechin (10) (Table 1). To compensate for low ITMS resolution ($\Delta m/z$ in the studied mass range 0.1), chromatographic separation of the above ions had to be assured. To this end, the retention of individual compounds was studied varying formate buffer concentration (1–20 mM ammonium formate), pH (2.5–4.0), and gradient of acetonitrile as organic modifier. To match the composition of tequila samples, all standards were prepared in 40 % v/v ethanol. The chromatographic conditions finally selected are given in Materials and Methods, whereas the retention times with respective relative standard deviation values and *m/z* values used for EIC are presented in Table 1. Figure 1 shows the extracted ion chromatograms for the mixed standard solution containing 0.5 mg l⁻¹ of each compound (in Fig. 2S in ESM the overlaid chromatograms for 1.0 and 2.5 mg l⁻¹ are presented). Linear regression functions were obtained (*R*>0.997 for all compounds), and analytical parameters were assessed following ICH procedures (ICH 2012). Specifically, detection and quantification limits (DL, QL) were evaluated based on signal-to-noise ratio; the criterions of three and ten standard deviations were adopted for DL and for QL, respectively. For each analyte, the signal was obtained for the lowest calibration standard and the noise was evaluated from the baseline acquired from blank chromatogram in the respective elution region. The results obtained are presented in Table 1 (linear regression parameters can be found in Table 1S, ESM).

For water-ethanol standard solutions, the chromatographic run was accomplished in 11 min (Fig. 1, Fig. 2S); however, in the application to tequila samples, irreproducible elution profiles were observed in successive injections. It was necessary

Table 1 Molecular mass values, m/z used for EIC, retention times, and detection/quantification limits evaluated for 34 phenolic compounds based on linear regression calibration

Phenolic compound	MM (Da)	EIC m/z	T_{ret} (min) (RSD, %) ^a	DL ^b ($\mu\text{g l}^{-1}$)	QL ^c ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Negative ESI					
1 Gallic acid	170.0	169	2.25 (0.91)	2.35	7.83
2 Homogentisic acid	168.0	167	2.55 (0.48)	2.66	8.87
3 Protocatechuic acid	154.0	153	3.10 (0.47)	2.56	8.53
4 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	168.0	167	3.30 (0.67)	11.1	37.1
5 Chlorogenic acid	354.1	353	3.40 (0.69)	2.57	8.57
6 Catechin	290.1	289	3.90 (0.62)	2.80	9.33
7 Resorcinol	110.0	109	4.20 (0.45)	67.0	223
8 2,5-Dihydroxybenzoic acid	154.0	153	4.20 (0.48)	7.79	26.0
9 4-Hydroxybenzoic acid	138.0	137	4.85 (0.22)	10.9	36.4
10 Epicatechin	290.1	289	5.15 (0.33)	3.22	10.7
11 2,3-Dihydroxybenzoic acid	154.0	153	5.10 (0.26)	5.83	19.4
12 Caffeic acid	180.0	179	5.30 (0.25)	3.00	10.0
13 Catechol	110.0	109	5.35 (0.26)	17.9	59.7
14 Vanillic acid	168.0	167	5.35 (0.22)	19.1	63.5
15 Syringic acid	198.1	197	5.40 (0.25)	10.0	33.5
16 2,4-Dihydroxybenzoic acid	154.0	153	5.40 (0.24)	1.96	6.53
17 Homovanillic acid	182.1	181	5.55 (0.21)	8.17	27.2
18 3-Hydroxybenzoic acid	138.0	137	5.85 (0.10)	9.65	32.2
19 4-Hydroxyphenylpropionic acid	166.1	165	6.40 (0.02)	2.85	9.50
20 3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	182.1	181	6.60 (0.01)	10.3	34.4
21 2,6-Dihydroxybenzoic acid	154.0	153	6.55 (0.07)	2.34	7.80
22 <i>p</i> -Coumaric acid	164.0	163	6.70 (0.02)	4.86	16.2
23 Synapic acid	224.1	223	6.90 (0.04)	2.34	7.80
24 Ferulic acid	194.1	193	7.00 (0.02)	1.81	6.03
25 3,4-Dimethoxybenzoic acid	182.1	181	7.25 (0.01)	25.6	85.5
26 <i>m</i> -Coumaric acid	164.0	163	7.27 (0.02)	1.28	4.27
27 <i>o</i> -Anisic acid	152.0	151	7.30 (0.02)	75.0	250
28 <i>trans</i> 2-Hydroxycinnamic acid	164.0	163	7.80 (0.01)	2.67	8.90
29 Salicylic acid	138.0	137	7.90 (0.02)	9.24	30.8
30 Benzoic acid	122.0	121	8.00 (0.14)	56.4	188
31 Cinnamic acid	148.1	147	9.22 (0.12)	28.0	93.3
32 4-Methoxycinnamic acid	178.1	177	9.21 (0.03)	24.9	83.1
Positive ESI					
27 <i>o</i> -Anisic acid	152.0	153	7.30 (0.02)	4.29	14.3
33 Caffeine	194.1	195	3.90 (0.78)	5.54	18.5
34 Coumarin	146.0	145	8.80 (0.04)	28.0	93.3

^a Relative standard deviation evaluated based on ten successive injections of the mixed standard

^b Calibration detection limit evaluated as S/N ratio 3:1

^c Calibration quantification limit evaluated as S/N ratio 10:1

to increase acetonitrile gradient for complete elimination of sample components from the column (60–90 % B during additional 2 min), and then the column had to be re-equilibrated with 15 % B for 4 min (“Materials and Methods”). Using longer, 17 min run, the retention times for individual compounds in tequila samples were highly

reproducible and consistent with those obtained in calibration solutions (Tables 1 and 2, Fig. 2). In Fig. 2, the selected EIC chromatograms obtained for the rested tequila R2 and for this same sample after mixed standard addition are presented. The quantification results and the recoveries evaluated in this experiment are presented in Table 2. As can be observed, the

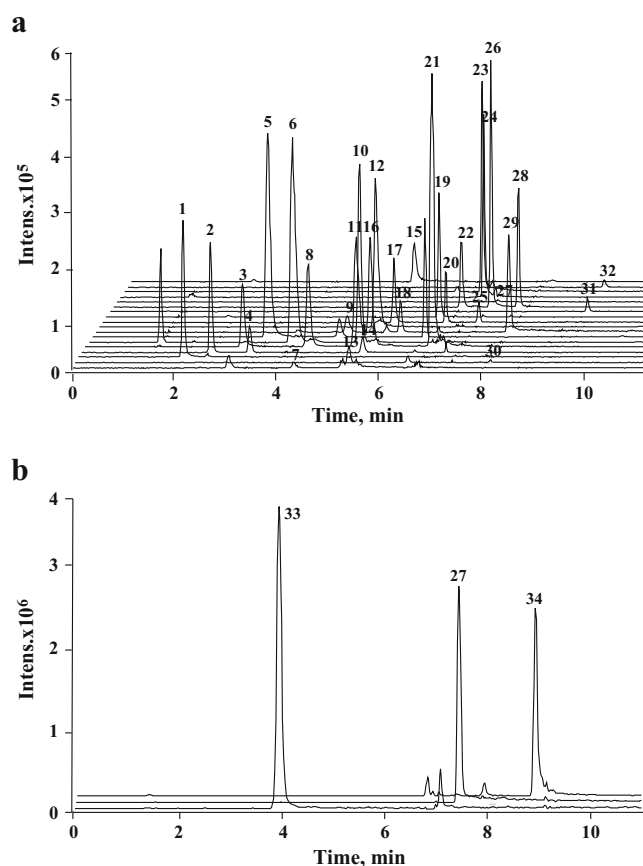


Fig. 1 Extracted ion chromatograms obtained for the calibration solution containing 34 compounds (0.5 mg l^{-1} each). Individual compounds are numbered as in Table 1. **a** Negative ESI mode, extracted m/z values 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177, and 197. **b** Positive ESI mode, extracted m/z values 195, 151, and 147

recoveries for individual compounds were in the range 74–118 %, confirming the feasibility of the proposed procedure for quantitative analysis in tequila samples. Taking together, the identity of phenolic compounds in tequila was confirmed by comparing their retention times in EIC with those obtained for respective standards and also by the method of standard addition; the individual compounds were quantified by linear regression calibration.

Tequila Analysis

Among 34 phenolic compounds included in this study, the following ten were found and quantified in tequilas: gallic acid (1), procatechuic acid (3), 4-hydroxybenzoic acid (9), vanillic acid (14), syringic acid (15), homovanillic acid (17), 3-hydroxybenzoic acid (18), ferulic acid (24); salicylic acid (29), and benzoic acid (30). The results obtained are summarized in Table 3 (detailed results for individual compounds in each sample are provided in Table 2S in ESM). As can be observed in Table 3 and also in Fig. 3, where base peak

chromatograms for the white, rested, and aged products from this same company are presented, the profiles of phenolic compounds were clearly different, depending on the aging conditions.

For B1–B6 samples, total small phenolics concentrations were lower with respect to the aged liquors, as indicated in Table 3 by respective median value $118 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ and the concentration range $36\text{--}408 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ (medians for R1–R12 and A1–A4 $1,699$ and $2,048 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$). In the non-maturated products, homovanillic acid (17) was present as the most abundant compound (except B3); other phenolic acids determined in these white tequilas were procatechuic (B3), vanillic (B3), 3-hydroxybenzoic (B4, B5), and ferulic (B3, B4) (Table 3, Table 2S). Unlike white, the samples of rested tequila contained all ten compounds; relatively high concentrations corresponded to syringic (15) and vanillic (14) acids; lower concentrations were determined for procatechuic (3), gallic (1), benzoic (30), homovanillic (17) acids, and the other four compounds were present only in few samples (compounds 9, 18, 24, 29, Table 3, Table 2S). There were important differences in the number of compounds and their concentrations found in R1–R12 samples, suggesting dissimilarities in the maturation procedures or in the aging conditions applied by different companies. Noteworthy is that more phenolic compounds were found in the rested as compared to the aged tequilas. In particular, 4-hydroxybenzoic acid (determined in R2, R4), 3-hydroxybenzoic acid (R5, R7, R10, R11), and benzoic acid (R1, R2, R4, R9) were not detected in any of the aged liquors, and this issue calls for further investigation of the early stage of liquor maturation. On the other part, four compounds were present at elevated concentrations in A1–A4 with respect to R1–R12 and B1–B6 groups, and their decreasing order was as follows: syringic acid (15) > vanillic acid (14) > procatechuic acid (3) > gallic acid (1). The aged tequilas contained also traces of salicylic acid (29), but ferulic acid (24) was found only in A1 sample and at relatively low concentration.

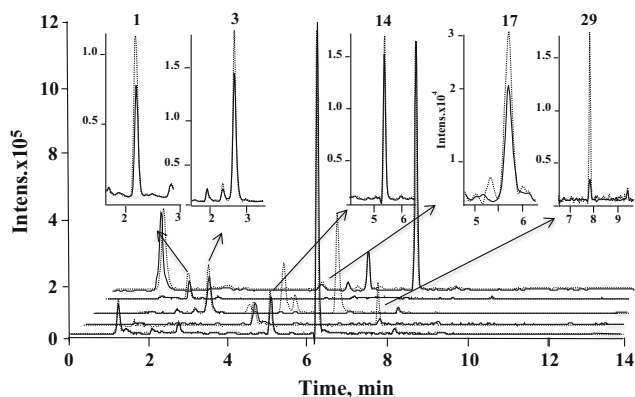
In comparison of our results with those reported in a sole previous work (Munoz-Munoz et al. 2008), we have found similar concentrations of gallic and ferulic acids in the aged tequila (values in the cited work, 190 and $20 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, respectively) and about four to ten times higher concentrations of procatechuic, vanillic, and syringic acids (previously reported mean values 50 , 120 , and $310 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ vs. median values obtained in this work 298 , 593 , and $1,223 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, respectively, Table 3). Furthermore, Munoz-Munoz et al. observed decreased concentrations of all five compounds in the rested as compared to aged tequila (Munoz-Munoz et al. 2008). In this aspect, our results are coherent for total phenolics, syringic (15), vanillic (14), and procatechuic (3) acids, but for gallic (1) acid, the differences between aged and rested tequilas were not clear. In particular, the unpaired t test indicated statistically higher concentrations of total phenolics in A1–A4 with

Table 2 Recovery experiment (sample R2, triplicate analysis): Retention times of individual compounds, mean concentrations with respective standard deviations obtained without standard addition (no SA), afteraddition of the mixed standard (SA, 150 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound as referred to undiluted sample), and the recovery percentages (*R*)

Analyte	T_{ret} (RSD) ^a min (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g l}^{-1}$)		<i>R</i> (%)	Analyte	T_{ret} (RSD) ^a min (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g l}^{-1}$)		<i>R</i> (%)	
		no SA	SA				no SA	SA		
Negative ESI										
1	2.21 (1.6)	116 \pm 1	287 \pm 8	114	17	5.65 (1.2)	175 \pm 9	295 \pm 7	80.0	
2	2.57 (0.7)	77 \pm 12	216 \pm 19	92.7	18	5.85 (0.2)	nd	134 \pm 12	89.3	
3	3.11 (0.5)	679 \pm 6	790 \pm 21	74.0	19	6.40 (0.1)	nd	124 \pm 24	82.7	
4	3.32 (0.7)	nd	173 \pm 16	115	20	6.61 (0.2)	nd	143 \pm 9	95.3	
5	3.39 (0.7)	nd	139 \pm 14	92.7	21	6.54 (0.2)	nd	162 \pm 8	108	
6	3.91 (0.7)	nd	141 \pm 23	94.0	22	6.69 (0.2)	nd	172 \pm 18	115	
7	4.19 (0.6)	nd	177 \pm 18	118	23	6.89 (0.1)	nd	128 \pm 19	85.3	
8	4.20 (0.5)	nd	140 \pm 15	93.3	24	7.00 (0.1)	nd	151 \pm 11	101	
9	4.83 (1.1)	157 \pm 2	289 \pm 19	88.0	25	7.24 (0.1)	nd	173 \pm 15	115	
10	5.15 (0.6)	nd	146 \pm 11	97.3	26	7.27 (0.1)	nd	129 \pm 10	86.0	
11	5.12 (0.9)	nd	141 \pm 15	94.0	27	7.32 (0.2)	nd	131 \pm 9	87.3	
12	5.35 (0.9)	nd	177 \pm 12	118	28	7.80 (0.1)	nd	161 \pm 7	107	
13	5.36 (0.4)	nd	167 \pm 10	111	29	7.91 (1.0)	55 \pm 3	201 \pm 10	97.3	
14	5.37 (0.2)	785 \pm 24	961 \pm 38	117	30	8.00 (0.1)	1,036 \pm 104	1,148 \pm 96	74.7	
15	5.42 (0.9)	1,290 \pm 20	1,430 \pm 52	93.3	31	9.21 (0.2)	nd	148 \pm 8	98.7	
16	5.41 (0.3)	13.5 \pm 0.1	166 \pm 13	102	32	9.22 (0.1)	77 \pm 12	219 \pm 13	94.7	
Positive ESI										
27	7.30 (0.1)	nd	162 \pm 12	108	34	8.80 (0.1)	nd	151 \pm 8	101	
33	3.91 (0.8)	nd	151 \pm 9	101						

^a Retention time with respective relative standard deviation, evaluated based on five successive sample injections

respect to R1–R12 samples ($p < 0.0080$) as well as higher syringic ($p < 0.0069$), vanillic ($p < 0.0486$), and procatechuic ($p < 0.0404$) acids. Finally, in contrast to the present work, Munoz-Munoz et al. did not detect any phenolic acid in white tequila. Worth to mention that the detection power of the HPLC-DAD procedure used in the cited work was poorer with respect to the HPLC-ESI-ITMS, which may be a reason

**Fig. 2** Selected EIC (m/z 167, 137, 153, 169, 181) obtained for the rested tequila R2 and this same sample after standard addition (0.15 mg l^{-1} of each compound as referred to undiluted sample)

for differences in the results obtained, especially for white tequilas. Another study, centered at the evaluation of phenolic compounds in agave-derived alcohol beverages that are matured in wooden barrels, was carried out in mezcal produced in North Mexico from *Agave durangensis* (Ávila-Reyes et al. 2010). In that work, syringic, benzoic, synapic, and non-identified derivatives of hydroxycinnamic and benzoic acids were found in the samples matured for at least 200 days. Therefore, the detection of benzoic, 3-hydroxybenzoic, and 4-hydroxybenzoic acids in some rested tequilas (Table 3, Table 2S) seems interesting, even though the concentrations reported by Ávila-Reyes et al. were significantly higher as compared to those obtained in our work or reported by Munoz-Munoz et al. (Munoz-Munoz et al. 2008). Overall, our results indicate that syringic, procatechuic, and vanillic acids together with total phenolics concentrations might be considered as potential aging markers of tequila, because these parameters were statistically different between rested and aged tequilas even as evaluated for a small sample set.

The interesting finding of this work is the presence of homovanillic acid (17) in all three tequila types, within the ranges $<DL-301 \mu\text{g l}^{-1}$ for white, $30-330 \mu\text{g l}^{-1}$ for rested, and $<DL-191 \mu\text{g l}^{-1}$ for aged tequilas (Table 3, Table 2S). It

Table 3 Median values and concentration ranges ($\mu\text{g l}^{-1}$) of small phenolic compounds determined in tequila samples by HPLC–ESI–ITMS

Phenolic compound	White tequilas (B1–B6)		Rested tequilas (R1–R12)		Aged tequilas (A1–A4)	
	Median	Range	Median	Range	Median	Range
1	<DL	–	215	<DL–494	216	106–421
3	26	<QL–26	117	39–679	298	186–667
9	<DL	–	165	<DL–157	<DL	–
14	107	<DL–107	348	135–788	593	450–764
15	<DL	–	740	<DL–1,290	1,223	860–1,890
17	82	<DL–301	153	27–330	162	<DL–191
18	81	<DL–107	96	<DL–102	<DL	–
24	35	<DL–49	55	<DL–55	32	<DL–32
29	<DL	–	47	<DL–55	47	<DL–49
30	<DL	–	696	<DL–1,036	<DL	–
Total phenolics	118	36–408	1699	515–4,296	2,664	2,048–3,249

<DL not detected; <QL detected below QL

was determined almost in all samples (except B3, A2), which seems to suggest that this compound may originate from *A. tequilana* plant or can be formed during tequila elaboration. It should be stressed that homovanillic acid was determined from EIC at m/z 181 and was baseline resolved from the compounds 20 and 25 presenting this same m/z upon ionization in negative ESI (Table 1); the recovery obtained for this specific compound in tequila R2 was 80 % (Table 2, Fig. 2), evidence that exclude an artifact character of the analytical signal.

Worth to note that in addition to ten compounds included in Table 3 and discussed before, the results obtained for the rested and the aged tequilas suggest the presence (below the quantification limit) of homogentisic acid (R2), caffeic acid (R8), 2,4-dihydroxybenzoic acid (R2, R3, R10, A1), *m*-coumaric acid (R10, A1), caffeine (R7, A1), and coumarin

(R4), which calls for further investigation of phenolic compounds in this popular alcoholic beverage.

Conclusions

A high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–ion trap mass spectrometry (HPLC–ESI–ITMS) procedure has been established in this work for the determination of 34 small phenolic compounds, typically analyzed in plant-derived products, with QLs in the range of 4.27–223 $\mu\text{g l}^{-1}$ and with a total analytical run of 17 min. The evaluated analytical figures of merit and the results of recovery experiments have proved suitability of this procedure for the determination of small phenolics in tequila at sub-part per million concentrations with minimum sample treatment and using linear regression calibration (40 % ethanol *v/v* added to standard solutions for matrix matching). In the analysis of 22 tequila samples, ten compounds were quantified and six others were detected below their QL. The results obtained indicate that the main source of small phenolic compounds in tequila is the maturation process in wooden barrels; syringic, vanillic, procatechuic acids, and total small phenolics concentrations might be considered as possible aging markers. Since higher variability of compounds and their concentrations was found in the rested as compared to the aged tequilas, further studies focusing early stage of maturation are needed. Furthermore, the results obtained suggest that some phenolic compounds might originate from the plant raw material or could be formed during tequila elaboration, which also calls for further investigation. Overall, the proposed here HPLC–ESI–ITMS procedure is a non-laborious and convenient alternative for

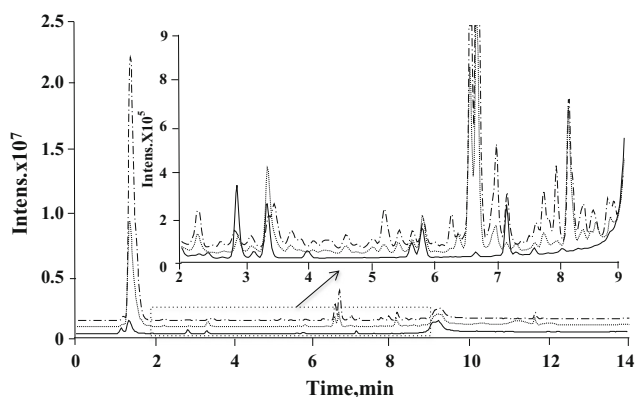


Fig. 3 Base peak chromatograms obtained for white (straight line), rested (dotted line), and aged (broken line) tequila from this same company (samples B4, R5, and A1, respectively)

assessment of phenolic profiles in tequila and it might be also used in the analysis of other spirits.

Acknowledgments The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), projects 123732, 178553, and 187749, is gratefully acknowledged.

Conflict of Interest Armando Alcazar Magana declares that he has no conflict of interest. Kazimierz Wrobel declares that he has no conflict of interest. Julio Cesar Torres Elguera declares that he has no conflict of interest. Alma Rosa Corrales Escobosa declares that she has no conflict of interest. Katarzyna Wrobel declares that she has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Ahumada-Santos YP, Montes-Avila J, Uribe-Beltrán MJ, Díaz-Camacho SP, López-Angulo G, Vega-Aviña R, López-Valenzuela JA, Heredia JB, Delgado-Vargas F (2013) Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Ind Crops Prod* 49:143–149
- Almaraz-Abarca N, González-Elizondo MS, da Graca Campos M, Ávila-Sevilla ZE, Delgado-Alvarado EA, Ávila-Reyes JA (2013) Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Bot Sci* 91:295–306
- Ávila-Reyes JA, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, González-Valdez LS, Valencia del Toro G, Durán Páramo E (2010) Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. *Food Res Int* 43:296–300
- Bai BX, He F, Yang LL, Chen F, Reeves MJ, Li JM (2013) Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chem* 141:3984–3992
- Ben Hamissa AM, Seffen M, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P, Converti A (2012) Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food Bioprod Proc* 90:17–21
- Carreon-Alvarez A, Casillas N, Ibanez JG, Hernandez F, Prado-Ramirez R, Barcena-Soto M, Gomez-Salazar S (2008) Determination of Cu in tequila by anodic stripping voltammetry. *Anal Lett* 41:469–477
- Cerezo AB, Tesfaye W, Soria-Diaz ME, Torija MJ, Mateo E, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM (2010) Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *J Food Compos Anal* 23:175–184
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352
- Gratacós-Cubarsi M, Ribas-Agustí A, García-Regueiro JA, Castellari M (2010) Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*. *Food Chem* 121:257–263
- Hafeez Laghari A, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A (2011) Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem* 126:1850–1855
- ICH (2012) Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1). http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- Khadem S, Marles RJ (2010) Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules* 15:7985–8005
- Khanam UKH, Oba S, Yanase E, Murakami Y (2012) Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J Funct Food* 4:979–987
- Labronici Bertin R, Gonzaga LV, da Silva Campelo Borges G, Stremel Azevedo M, França Maltez H, Heller M, Micke GA, Ballod Tavares LB, Fett R (2014) Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC–ESI-MS/MS. *Food Res Int* 55:404–411
- Lachenmeier DW, Sohnius EM, Attig R, Lopez MG (2006) Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *J Agric Food Chem* 54:3911–3915
- Liu Q, Wu L, Pu H, Li C, Hu Q (2012) Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus*). *Food Chem* 135:616–622
- Luo C, Wang X, Gao G, Wang L, Li Y, Sun C (2013) Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI-MS/MS. *Food Chem* 141:2697–2706
- Madrera RR, Valles BS, Garcia YD, Arguelles PD, Lobo AP (2010) Alternative woods for aging distillates—an insight into their phenolic profiles and antioxidant activities. *Food Sci Biotechnol* 19:1129–1134
- Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol Adv* 29:365–373
- Morales-Serna JA, Jiménez A, Estrada-Reyes R, Marquez C, Cárdenas J, Salmón M (2010) Homoisoflavanones from *Agave tequilana* Weber. *Molecules* 15:3295–3301
- Munoz-Munoz AC, Grenier AC, Gutierrez-Pulido H, Cervantes-Martinez J (2008) Development and validation of a high performance liquid chromatography–diode array detection method for the determination of aging markers in tequila. *J Chromatogr A* 1213:218–223
- Muñoz Rodriguez D, Wrobel K, Wrobel K (2005) Determination of aldehydes in tequila by high performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Eur Food Res Technol* 221:798–802
- Nixdorf SL, Hermosin-Gutierrez I (2010) Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal Chim Acta* 659:208–215
- Nogueira N, Guyot S, Marnet N, Lequéré JM, Drilleau JF, Wosiacki G (2008) Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. *Braz Arch Biol Tech* 51:1025–1032
- Pena-Alvarez A, Capella S, Juarez R, Labastida C (2006) Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1134:291–297
- Prado-Ramirez R, Gonzales-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, Casillas N, Estarron M, Gomez-Hernandez H (2005) The role of distillation on the quality of tequila. *Int J Food Sci Technol* 40:701–708
- Rodriguez Flores C, Landero Figueroa JA, Wrobel K, Wrobel K (2009) ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila. *Eur Food Res Technol* 228:951–958
- Santos-Zea L, Leal-Diaz AM, Cortes-Ceballos E, Gutiérrez-Urbe JA (2012) Agave (*Agave spp.*) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Curr Bioact Comp* 8:218–231
- Sanz M, de Simon BF, Cadahia E, Esteruelas E, Munoz AM, Hernandez T, Estrella I, Pinto E (2012) LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *J Mass Spectrom* 47:905–918
- Sentandreu E, Cerdan-Calero M, Sendra JM (2013) Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection

- coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. *J Food Compos Anal* 30:32–40
- Sun J, Liang F, Bin Y, Li P, Duan CQ (2007) Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules* 12:679–693
- Vallejo-Cordoba B, Gonzalez-Cordova AF, Estrada-Montoya MC (2004) Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem* 52:5567–5571
- Wu X, Ding W, Zhong J, Wan J, Xie Z (2013) Simultaneous qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in *Aloe barbadensis* Mill by liquid chromatography–mass spectrometry–ion trap–time-of-flight and high performance liquid chromatography–diode array detector. *J Pharm Biomed Anal* 80: 94–106

Electronic Supplementary Material

Journal: Food Analytical Methods

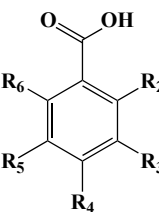
Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography – Ion Trap Mass Spectrometry

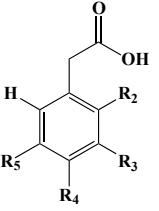
Armando Alcazar Magana, Kazimierz Wrobel, Julio Cesar Torres Elguera, Alma Rosa Corrales Escobosa, Katarzyna Wrobel*

Chemistry Department, University of Guanajuato, 36000 Guanajuato, Mexico

* Corresponding author. Phone: +52 473 7327555, Fax: +52 472 7326252, E-mail:
katarzyn@ugto.mx

Fig. 1S. Structures of phenolic compounds analyzed

Structure	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Name	Number
	H	OH	OH	OH	H	Gallic acid	1
	H	OH	OH	H	H	Protocatechuic acid	3
	OH	H	H	OH	H	2,5-Dihydroxybenzoic acid	8
	H	H	OH	H	H	4-Hydroxybenzoic acid	9
	OH	OH	H	H	H	2,3-Dihydroxybenzoic acid	11
	H	OCH ₃	OH	H	H	Vanillic acid	14
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Syringic acid	15
	OH	H	OH	H	H	2,4-Dihydroxybenzoic acid	16
	H	OH	H	H	H	3-Hydroxybenzoic acid	18
	OH	H	H	H	OH	2,6-Dihydroxybenzoic acid	21
	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	3,4-Dimethoxybenzoic acid	25
	H	OCH ₃	H	H	H	o-Anisic acid	27
	OH	H	H	H	H	Salicylic acid	29
	H	H	H	H	H	Benzoic acid	30

Structure	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Name	Number	
	OH	H	H	OH	Homogentisic acid	2	
	H	OH	OH	H	H	3,4-Dihydroxyphenyl acetic acid	4
	H	OCH ₃	OH	H	H	Homovanillic acid	17

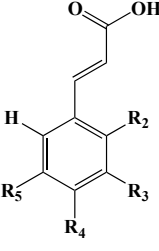
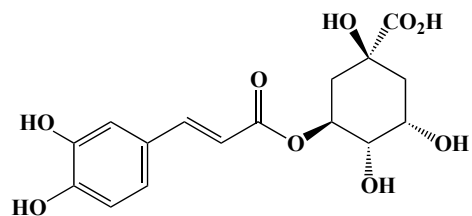
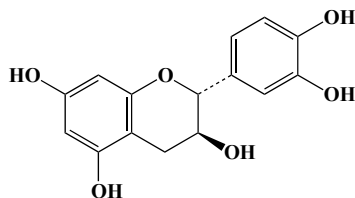
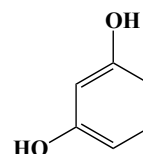
Structure	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Name	Number	
	H	OH	OH	H	Caffeic acid	12	
	H	H	OH	H	H	p-Coumaric acid	22
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Sinapic acid	23
	H	OCH ₃	OH	H	H	Ferulic acid	24
	H	OH	H	H	H	m-Coumaric acid/ <i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	26
	OH	H	H	H	H	<i>trans</i> -2-Hydroxycinnamic acid	28
	H	H	H	H	H	Cinnamic acid	31
	H	H	OCH ₃	H	H	4-Methoxycinnamic acid	32

Fig. 1S. Structures of phenolic compounds analyzed

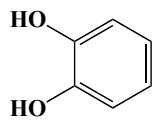
Chlorogenic acid (5)



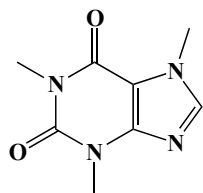
(+)-Catechin (6); (-)-Epicatechin (10)



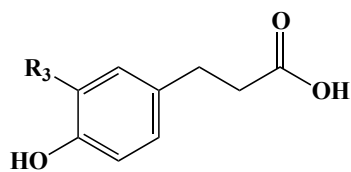
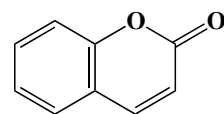
Resorcinol (7)



Catechol (13)



Caffeine (33)

(R₃=H) 4-Hydroxyphenylpropionic acid (19)
(R₃=OH) 3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid (20)

Coumarin (34)

Fig.2S Extracted ion chromatograms obtained for the calibration solutions containing 34 compounds at two concentration levels: 1.0 and 2.5 mg l⁻¹ each. Individual compounds are numbered according to Fig. 1S

(a) negative ESI mode, extracted *m/z* values: 109, 121, 169, 167, 153, 289, 353, 137, 179, 181, 165, 147, 163, 151, 193, 223, 177, 197

(b) positive ESI mode, extracted *m/z* values: 195, 151, 147

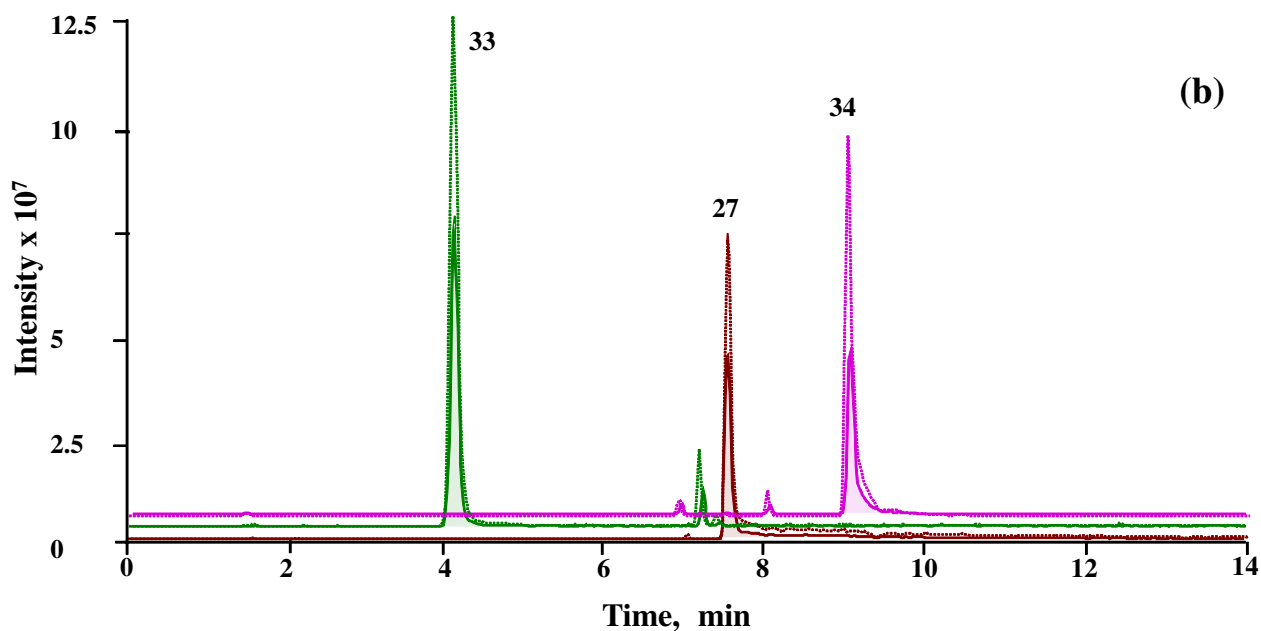
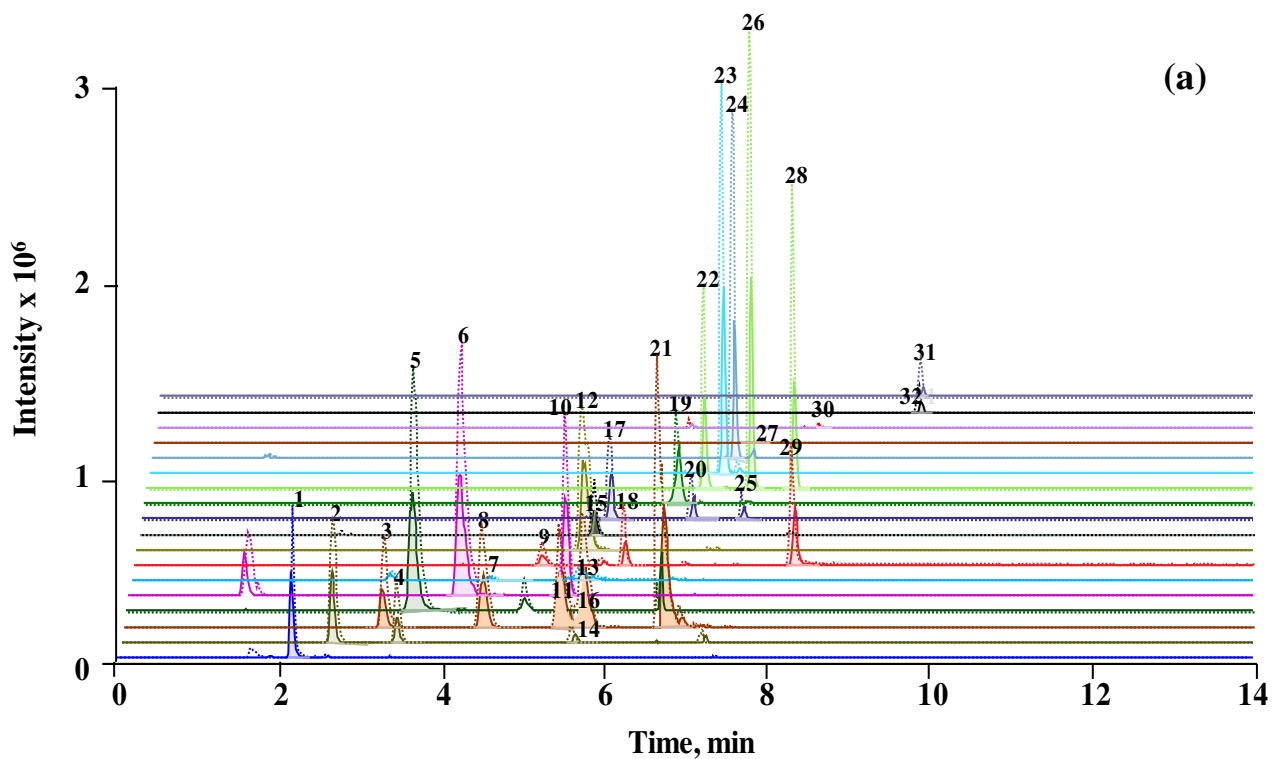


Table 1S. Analytical parameters evaluated for 34 phenolic compounds using HPLC-ESI-ITMS procedure.

Analyte	Linear regression function ^a	R	RSD slope ^b	LD ^c , pmol	LQ ^d , pmol	CV ^e , %
<i>Negative ESI</i>						
1	$A = (3.233c + 0.135)10^6$	0.9918	2.2	0.14	0.45	2.3
2	$A = (1.198c - 0.046)10^6$	0.9985	7.4	0.16	0.54	3.5
3	$A = (1.502c + 0.022)10^6$	0.9991	0.4	0.17	0.56	1.2
4	$A = (0.321c - 0.01)10^6$	0.9988	5.1	0.66	2.20	1.9
5	$A = (11.16c + 0.140)10^6$	0.9980	3.9	0.07	0.25	0.9
6	$A = (5.836c + 0.023)10^6$	0.9998	0.9	0.10	0.32	2.7
7	$A = (0.128c + 0.135)10^6$	0.9976	0.3	6.09	20.3	3.9
8	$A = (2.18c + 0.101)10^6$	0.9991	3.8	0.51	1.69	3.2
9	$A = (0.563c + 0.001)10^6$	0.9993	6.5	0.79	2.63	2.8
10	$A = (3.651c + 0.161)10^6$	0.9977	1.4	0.11	0.37	3.1
11	$A = (6.320c + 0.131)10^6$	0.9973	2.5	0.38	1.25	2.8
12	$A = (5.702c + 0.009)10^6$	0.9986	5.6	0.17	0.56	3.3
13	$A = (0.674c + 0.054)10^6$	0.9999	4.4	1.63	5.43	4.7
14	$A = (0.259c - 0.001)10^6$	0.9997	3.4	1.14	3.79	5.2
15	$A = (0.572c + 0.003)10^6$	0.9989	0.7	0.50	1.68	2.6
16	$A = (2.756c + 0.017)10^6$	0.9997	2.4	0.13	0.44	2.4
17	$A = (0.179c - 0.001)10^6$	0.9987	6.1	0.45	1.50	5.1
18	$A = (0.437c + 0.009)10^6$	0.9993	5.9	0.70	2.34	4.2
19	$A = (1.148c + 0.067)10^6$	0.9978	6.0	0.17	0.56	3.2
20	$A = (0.661c + 0.001)10^6$	0.9999	7.3	0.57	1.88	5.0
21	$A = (6.517c + 0.380)10^6$	0.9953	1.5	0.15	0.50	1.9
22	$A = (1.438c + 0.123)10^6$	0.9937	2.7	0.30	0.99	1.7
23	$A = (2.655c + 0.021)10^6$	0.9994	3.1	0.10	0.34	1.1
24	$A = (1.648c + 0.019)10^6$	0.9994	2.4	0.09	0.31	2.4
25	$A = (0.305c + 0.008)10^6$	0.9982	2.5	1.41	4.68	4.8
26	$A = (3.088c - 0.047)10^6$	0.9997	5.8	0.08	0.26	1.9
27	$A = (0.720c + 0.051)10^6$	0.9975	0.4	4.93	16.5	4.2
28	$A = (1.200c - 0.022)10^6$	0.9993	1.0	0.16	0.55	3.2
29	$A = (2.239c + 0.097)10^6$	0.9942	2.3	0.67	2.22	1.1
30	$A = (0.479c + 0.001)10^5$	0.9991	3.7	4.62	15.4	4.1
31	$A = (0.248c + 0.004)10^6$	0.9917	1.0	1.89	6.30	7.2
32	$A = (0.190c + 0.011)10^6$	0.9903	0.8	1.40	4.66	8.1
<i>Positive ESI</i>						
27	$A = (2.724c + 0.118)10^8$	0.9911	2.7	0.28	0.94	1.3
33	$A = (0.961c + 0.011)10^8$	0.9944	0.4	0.28	0.94	2.1
34	$A = (0.250c - 0.001)10^8$	0.9987	3.4	19.2	6.39	1.0

^a- A – peak area, c – $\mu\text{g l}^{-1}$

^b- relative standard deviation of the slope evaluated for three replicates of calibration, carried out in different days;

^c- on-column detection limit (pmol) evaluated based on S/N 3:1, as explained in the main text;

^d- on-column quantification limit (pmol) evaluated based on S/N 10:1;

^e- coefficient of variance evaluated based on 5 successive replicates of calibration standard (0.1 mg l^{-1}).

Table 2S. Concentrations of individual phenolic compounds determined in white, rested and aged tequilas (B1 - B6, R1 - R12, A1 - A4, respectively); mean values for three replicates are presented in $\mu\text{g l}^{-1}$ and empty cells indicate that the compound was not detected.

	Individual phenolic compounds in tequilas; mean values \pm SD, $\mu\text{g l}^{-1}$										
	1	3	9	14	15	17	18	24	29	30	Σ
<i>White tequilas</i>											
B1						39 \pm 2					39
B2		< QL				82 \pm 4					82
B3		26 \pm 2		107 \pm 9				21 \pm 1			154
B4		< QL				213 \pm 7	55 \pm 2	49 \pm 1			317
B5						301 \pm 6	107 \pm 3				408
B6						36 \pm 5					36
<i>Rested tequilas</i>											
R1		39 \pm 3		236 \pm 11	390 \pm 12	27 \pm 2			47 \pm 1	935 \pm 45	1674
R2	116 \pm 11	679 \pm 12	157 \pm 12	788 \pm 14	1290 \pm 17	175 \pm 5			55 \pm 2	1036 \pm 37	4296
R3		82 \pm 3	< QL	760 \pm 12	940 \pm 21	36 \pm 3			< QL	175 \pm 21	1993
R4		213 \pm 10	172 \pm 15	467 \pm 12		96 \pm 4			< QL		948
R5	142 \pm 8	129 \pm 11		325 \pm 9	596 \pm 24	330 \pm 10	102 \pm 2	55 \pm 3	44 \pm 2		1723
R6	494 \pm 13	188 \pm 12		429 \pm 13	1090 \pm 45	139 \pm 4			< QL		2340
R7		48 \pm 3		195 \pm 14	351 \pm 24	222 \pm 8	64 \pm 1				880
R8	287 \pm 13	77 \pm 4		326 \pm 17	707 \pm 17	109 \pm 4					1506
R9	417 \pm 12	158 \pm 8	< QL	369 \pm 21	773 \pm 13	166 \pm 11				457 \pm 15	2340
R10	< QL	144 \pm 10	< QL	458 \pm 18	875 \pm 15	274 \pm 12	95 \pm 3				1846
R11		89 \pm 7		136 \pm 14		194 \pm 7	96 \pm 3				515
R12	26 \pm 2	105 \pm 10		290 \pm 21	630 \pm 18	128 \pm 7			< QL		1179
<i>Aged tequilas</i>											
A1	277 \pm 15	186 \pm 12		453 \pm 16	860 \pm 10	191 \pm 10		32 \pm 2	49 \pm 2		2048
A2	106 \pm 11	208 \pm 10		764 \pm 16	1890 \pm 28	< QL			< QL		2968
A3	421 \pm 12	667 \pm 16		732 \pm 15	1285 \pm 43	144 \pm 4			< QL		3249
A4	154 \pm 8	388 \pm 12		450 \pm 23	1161 \pm 25	162 \pm 5			45 \pm 3		2360



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Methylglyoxal is associated with bacteriostatic activity of high fructose agave syrups



Alma Rosa Corrales Escobosa, Armando Gomez Ojeda, Kazimierz Wrobel, Armando Alcazar Magana, Katarzyna Wrobel*

Chemistry Department, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2014

Received in revised form 20 May 2014

Accepted 26 May 2014

Available online 5 June 2014

Chemical compounds studied in this article:

Methylglyoxal (PubChem CID: 880)

Glyoxal (PubChem CID: 7860)

Diacetyl (PubChem CID: 650)

Hexane-3,4-dione (PubChem ID: 62539)

4-Methoxy-*o*-phenylenediamine

dihydrochloride (PubChem CID: 3085161)

Keywords:

High fructose agave syrup

Methylglyoxal

Hydrogen peroxide

Bacteriostatic activity

ABSTRACT

Three α -ketoaldehydes, potentially present in high fructose agave syrups (HFASs) as intermediates of the Maillard reaction, were determined. A previously reported HPLC-FLD procedure based on pre-column derivatisation with 4-methoxy-*o*-phenylenediamine was adopted, yielding the method quantification limits 0.11 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.09 mg/kg for glyoxal, methylglyoxal (MGo) and diacetyl, respectively. The obtained results revealed high concentrations of methylglyoxal in HFASs (average 102 ± 91 mg/kg, range 15.6–315 mg/kg) as compared to commercial Mexican bee honeys or corn syrups. Hydrogen peroxide was generated in all HFASs upon dilution, yet to less extent than in bee honeys. HFASs presented bacteriostatic activity against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*; catalase addition had minimum effect on the assay results in syrups with elevated MGo. Principal component analysis revealed direct association between growth inhibition and MGo. It is concluded that elevated concentration of MGo in HFASs is at least in part responsible for their non-peroxide bacteriostatic activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over centuries, plants of *Agavaceae* family have been extensively used for various culinary and medicinal purposes. These succulent plants contain phytochemicals, such as flavonoids and saponins, considered to be responsible for their anti-inflammatory, antiviral and anticancer activity (Ahumada-Santos et al., 2013; Santos-Zea, Leal-Diaz, Cortes-Ceballos, & Gutiérrez-Urbe, 2012). In addition, *Agave tequilana* Weber is used for elaboration of tequila and high fructose syrups. Traditionally, hydrolysis of fructans, mainly inulin, is accomplished by 36-h cooking of agave heads in a brick oven; this process is often complemented by additional acid hydrolysis (Waleckx, Gschaendler, Colonna-Ceccaldi, & Monsan, 2008). Alternatively, different inulinases of bacteria, fungi or yeast origin, have been introduced for enhanced recovery of monosaccharides, while avoiding acidification and prolonged heating (García-Aguirre et al., 2009; Waleckx et al., 2011). In the production of syrup, the obtained hydrolysate is filtered and submitted

to vacuum evaporation at 90 °C (Willems & Low, 2012). Agave syrup possesses a similar range of colour, density and flavour to bee honey or maple syrup; however its glycaemic index is about two times lower. The Mexican Official Norm regulates the saccharides in high fructose agave syrup (HFAS) from *A. tequilana* as follows: >80% fructose, <15% glucose, <4% sucrose, inulin > 0.5%; and pH in the range 4.0–6.0 (NMX-FF-110-SCFI, 2008).

Potential benefits and adverse effects of high fructose syrups as dietary sweeteners have been widely discussed, mainly in the context of their role in the development of obesity, diabetes and metabolic syndrome (Jones, 2009). In this regard, analysis of agave syrups has only recently been undertaken (Willems & Low, 2012), despite numerous studies reporting chemical composition of agave plants and bioactivity of plant extracts (Ahumada-Santos et al., 2013; Lachenmeier, Sohnius, Atting, & Lopez-Mercedes, 2006; Lopez, Mancilla-Margalli, & Mendoza-Diaz, 2003; Santos-Zea et al., 2012).

As already described, any elaboration process of HFAS involves heating, which together with slightly acidic conditions and the presence of proteins, favours the Maillard reaction (Willems & Low, 2012). Within the context of this work, possible generation

* Corresponding author. Tel.: +52 473 7327555; fax: +52 473 7326252.

E-mail address: katarzyn@ugto.mx (K. Wrobel).

of dicarbonyl compounds, as the products of sugar degradation, intermediates of non-enzymatic protein glycation and lipid peroxidation, is of special interest. At cellular level, the small α -ketoaldehydes are known to be cytotoxic, mutagenic, carcinogenic and pro-oxidant agents (Kovacic & Somanathan, 2011); however, these compounds confer flavour to food and some of them possess bactericidal, antiviral and even antitumour activity (Wang & Ho, 2012; White, 2009).

The health impact of exogenous α -ketoaldehydes ingested with food is not yet fully understood. It has been demonstrated that binding to digestive enzymes in the gastrointestinal tract might reduce their bioavailability; however, this same process would also contribute to the increased formation of advanced glycation end products (Amoroso, Maga, & Daglia, 2013; Papetti, Mascherpa, Marrubini, & Gazzani, 2013). As an example of this apparent controversy, methylglyoxal (MGo) is one of the constituents, which together with liberation of hydrogen peroxide, low pH and high osmolarity, is responsible for the well known antibacterial activity of bee honey (Degen, Vogel, Richter, Hellwig, & Henle, 2013; Irish, Blair, & Carter, 2011).

Based on the above considerations, this work has focused on the determination of glyoxal (Go), methylglyoxal (MGo), diacetyl (DMGo) and their possible association with the bacteriostatic activity of high fructose agave syrups. For comparative purposes, commercial Mexican bee honey and high fructose corn syrups have also been included. To the best of our knowledge, this is the first report on small α -ketoaldehydes in HFASs. The results obtained showed elevated concentrations of MGo as compared to other, randomly selected sweeteners of similar organoleptic properties (bee honey, corn syrups). Antibacterial activity of syrups was tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria strains. The results of principal component analysis (PCA) indicated that methylglyoxal is at least in part responsible for non-peroxide bacteriostatic properties of agave-based syrups.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionised water (18.2 M Ω cm) and HPLC-grade acetonitrile (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) were used throughout.

For the determination of α -ketoaldehydes, the standard solutions containing 1 mg/mL of glyoxal (Go, ethanedial, Fluka), methylglyoxal (MGo, 2-oxopropanal, Sigma) and diacetyl (DMGo, 2,3-butanedione, dimethylglyoxal, Fluka) were prepared in deionised water. The following Sigma reagents were also used: 4-methoxy-*o*-phenylenediamine dihydrochloride (4MPD, derivatising reagent), diethylglyoxal (DEGo, 3,4-hexanedione as internal standard) hydrochloric acid, acetic acid, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide, 2-mercaptoethanol, sodium chloride, triethylamine (TEA), glucose and fructose. Dicarbonyls potentially present in reagent solutions were eliminated by derivatisation with 4MPD and solid-phase extraction of respective quinoxalines (Supelcolean LC-18 SPE tube 3 mL; Supelco, Bellefonte, PA). Specifically, for 4MPD purification, a cartridge was conditioned with 3 mL of acetonitrile, 3 mL of acetonitrile:water (30:70) and then dried. Afterwards, 1 mL of 4MPD (20 mg/mL in acetonitrile:water (30:70)) was passed through at a flow rate of 0.5 mL/min and 10 μ L of 2-mercaptoethanol were added to the final solution. For purification of phosphate, fructose and glucose solutions, an aliquot of 4MPD was added; the mixture was left overnight at 60 °C and then purified from quinoxalines by SPE after cartridge conditioning with 3 mL acetonitrile and 3 mL water (Gomez Ojeda, Wrobel, Corrales Escobosa, Garay-Sevilla, & Wrobel, 2014). Working solutions of

Go, MGo, DMGo and DEGo (5 mg/L each) were prepared daily, using freshly purified deionised water.

For hydrogen peroxide determination, Amplex[®] Red Assay kit (A22189, Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was used.

For antibacterial assay, the components of nutrient broth and catalase (C9322) were purchased from Sigma.

Eight commercial agave syrups (A1–A8), three Mexican bee honeys (H1–H3) and three corn syrups (C1–C3) were purchased in a local market.

2.2. RP-HPLC-FLD analysis of α -ketoaldehydes

For the determination of glyoxal (Go), methylglyoxal (MGo) and diacetyl (DMGo), an aliquot of the sample was precisely weighed (1.0 g) and diluted with 25 mL of deionised water. Because of high MGo values found in agave syrups, for the precise determination of this analyte, HFASs were additionally ten times diluted before analysis. Pre-column derivatisation with 4-methoxy-*o*-phenylenediamine (4MPD) and reversed-phase separation of the obtained quinoxalines was carried out as described before (Gomez Ojeda et al., 2014). In brief, 200 μ L of diluted sample or calibration standard solution were mixed with 10 μ L of internal standard (10 μ g/mL DEGo) and 200 μ L of acetonitrile; the mixture was frozen (–20 °C, 30 min) and then centrifuged (10,000g, 5 min). For derivatisation, 150 μ L of the supernatant were mixed with 240 μ L of water, 60 μ L of phosphate buffer (500 mM, pH 7.4) and after vortexing, 10 μ L of 4MPD (20 mg/mL) were added. The mixture was incubated at 40 °C for 4 h. Finally, the sample was acidified with 10 μ L HCl (3 M), diluted with 200 μ L of acetonitrile, saturated with sodium chloride, vortexed and centrifuged (10,000g, 5 min); 75 μ L of acetonitrile layer were mixed with 150 μ L of the mobile phases A and C (1:1) containing 2-mercaptoethanol (5% m/v).

Agilent series 1200 liquid chromatographic system equipped with a quaternary pump, a well-plate autosampler, a column oven, a fluorimetric detector and a ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) was used; the chromatographic column Kinetex C18 (150 \times 3 mm, 2.6 μ m) and the C18 guard column were from Phenomenex (Torrance, CA). Separation of four quinoxalines was accomplished using three mobile phases (A – water; B – acetonitrile; C – 0.8% acetic acid, 0.6% triethylamine, pH 4.3) and the following gradient program: 0–1 min 70% A, 20% B, 10% C; 1–6 min 50% A, 40% B, 10% C; 6–8 min 20% A, 70% B, 10% C; 8–10 min 10% A, 80% B, 10% C; 10–10.2 min 70% A, 20% B, 10% C; 10.2–12 min 70% A, 20% B, 10% C, with total flow rate of 0.5 mL/min. The injection volume was 20 μ L and the column oven was kept at 40 °C. For fluorimetric detection, excitation and emission wavelengths were set at 344 nm and 420 nm, respectively.

The calibration was carried out using a series of mixed standard solutions containing Go, MGo, DMGo at 0; 25; 50; 75; 100; 200; 400, 800 μ g/L each, and 500 μ g/L of IS. For recovery evaluation, 200 μ L and 400 μ L of the standard solution (5 μ g/mL of each analyte) were added directly to samples H1 and A1 yielding 1 and 2 mg/kg of each compound added to the honey and agave syrup, respectively. As already mentioned, agave syrups contained higher concentrations of MGo as compared to Go and DMGo; therefore the recovery of this compound was evaluated in a separate experiment, in which 2.0 mL and 4.0 mL of standard solution (5 μ g/mL MGo) were added to A1 sample, yielding 10 and 20 mg/kg in agave syrup (additional ten-fold dilution applied as described before).

2.3. Hydrogen peroxide assay

The concentration of hydrogen peroxide produced by the agave syrups and honey samples was determined using a hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Amplex Red[®]). The assay was

conducted in HPLC autosampler vials; after 5 min from mixing the sample and reagents, aliquots (5 μ L) were introduced automatically (every 60 s) in flow injection mode, for fluorescence measurements using the FLD detector ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm). For quantification, five-point external calibration was carried out (0; 1.0; 5.0; 10; 15; 20 μ M H₂O₂); all samples were 1:10 diluted prior to analysis.

2.4. Assay of antibacterial activity

Antibacterial activity of eight agave syrups (A1–A8) and one bee honey (H1) was tested by a broth dilution spectrophotometric assay (Brudzynski, Abubaker, & Miotto, 2012; Patton, Barret, Brennan, & Moran, 2006). The two laboratory strains used for this purpose were Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* 168 and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* DH5. The stock solution 50% (w/v) of each sample was prepared by weighing 10 g of syrup or honey and bringing the volume to 20 mL with the nutrient broth. Further dilutions were done to obtain concentrations of 25%, 12.5%, 6.3%, 3.2% and 1.6% (w/v); all solutions were sterilised by filtration through 0.2- μ m filters (Millipore, Bedford, MA) prior to analysis. To examine possible contribution of H₂O₂ to the bacteriostatic activity, for each sample the assay was carried out in the absence and in the presence of catalase (600 U/ml solution in sterile water). A few single bacterial colonies from an overnight culture on nutrient agar were inoculated in a nutrient broth (Patton et al., 2006). Bacterial growth was monitored by measuring the culture optical density (OD at 620 nm, Spectronic 3000 Diode Array Milton Roy spectrophotometer). The bacterial suspension was further diluted with nutrient broth to obtain a final concentration of inoculum 1×10^6 CFU/mL. The final volume in each test tube was 1 mL, consisting of 0.95 mL diluted syrup or honey with or without catalase and 0.05 mL bacterial inoculum. For each assay, optical density of the sample containing inoculum and broth (OD_s) was measured together with the three following controls: (1) nutrient broth (OD_{broth}); (2) nutrient broth and inoculum (OD_{inoculum+broth}); (3) nutrient broth and syrup or honey (OD_{broth+sample}). The samples were incubated at 37 °C for 18 h; all tests were performed in triplicate and were repeated three times. The growth inhibition (Inh%) for each sample at different dilutions was determined by the formula:

$$\text{Inh} = [1 - (\text{OD}_s - \text{OD}_{\text{broth+sample}}) / (\text{OD}_{\text{inoculum+broth}} - \text{OD}_{\text{broth}})] \times 100\%$$

The lowest concentration of syrup or honey that prevented the growth of microorganism, as detected by lack of visual turbidity compared to a negative control (broth + sample), was recorded as the minimum inhibitory concentration (MIC).

2.5. Statistical analysis

The results presented are mean values obtained for three replicates. Standard deviations were calculated and graphs were plotted using Microsoft Excel 2007. Data were tested for statistical significance using the unpaired *t*-test included in Microsoft Excel 2007. For principal component analysis (PCA), The Unscrambler 7.0 software package was used (CAMO, Oslo, Norway). The significance was established at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Determination of dicarbonyl compounds

Three reactive α -ketoaldehydes considered in this work were glyoxal (Go), methylglyoxal (MGo) and diacetyl (DMGo). These compounds have not been determined in HFAS yet, but the first

two of them have often been assessed in bee honey (Arena, Ballistreri, Tomaselli, & Fallico, 2011; Kilty, Duval, Chan, Ferris, & Slinger, 2011; Mavric, Wittmann, Barth, & Henle, 2008) and, to a lesser extent, in corn syrups (Gensberger, Mittelmaier, Glomb, & Pischetsrieder, 2012; Lo et al., 2008). The third compound, diacetyl (DMGo), is a microbial fermentation product contributing to honey aroma (Agila & Barringer, 2013; Ruisinger & Schieberle, 2012) and, as a potential mediator of electron transfer reaction, possesses similar chemical activity to Go and MGo (Kovacic & Cooksy, 2005).

Reliable determination of reactive dicarbonyl compounds in high fructose syrups and in bee honey is challenging not only because of the complex chemical matrix and possible *de novo* generation of the above compounds during the analytical procedure, but also due to contamination problems related to their ubiquitous character (Gensberger et al., 2012; Lo et al., 2008; White, 2009). Specifically, the conditions applied at procedural stages before and during derivatisation should be as mild as possible, avoiding drastic changes of chemical parameters and prolonged heating that would promote Maillard reactions (White, 2009). In this regard, the reversed-phase liquid chromatography procedure recently developed for urine analysis has been adopted in this work (Gomez Ojeda et al., 2014). In brief, application of 4-methoxy-*o*-phenylenediamine (4MPD) as a derivatisation agent allowed the efficient formation of fluorescent quinoxalines under relatively mild reaction conditions (neutral pH, 40 °C, 4 h, in darkness), thus minimising the risk of changes in analyte concentrations before and during the course of reaction.

As to the sample pretreatment, simple dilution of bee honey or corn syrup has typically been used (Arena et al., 2011; Gensberger et al., 2012; Lo et al., 2008; Mavric et al., 2008; Oelschlaegel, Gruner, Wang, Boettcher, Koelling-Speer, & Speer, 2012a); whereas in this work, acetonitrile was added to the diluted syrup or honey sample for precipitation of matrix constituents (peptides, proteins, polysaccharides, nucleic acids). The derivatisation reaction was carried out in the supernatant and afterwards, the sample was acidified for the recovery of quinoxalines in this same solvent (acetonitrile), by means of salt-induced phase separation. The calibration solutions and the samples were processed identically, always in the presence of internal standard, so inevitable imprecision due to non-rigorous protocol was controlled. As highlighted by White in a comprehensive review, the internal standard has rarely been applied in the analysis of reactive dicarbonyl species in food products (White, 2009). In a recent study, diacetylquinoxaline was used in the analysis of corn syrups (Gensberger et al., 2012). Since diacetyl was found in all samples analysed in the present work, diethylglyoxal (DEGo) was selected as the internal standard and added directly to the samples and calibration solutions (Gomez Ojeda et al., 2014).

To check for probable *de novo* formation of α -ketoaldehydes in the course of analytical procedure and also to investigate possible contamination problems, an aqueous solution containing 80% fructose and 15% glucose (*m/v*) (NMX-FF-110-SCFI, 2008) was prepared and analysed by the entire RP-HPLC-FLD procedure as described in *Materials and Methods*. One portion was analysed directly and another portion was cleaned up by solid-phase extraction before the analysis. The concentrations of three compounds found in the standard glucose + fructose solution after SPE were below respective quantification limits; whereas without clean-up step these concentrations were: 27.3 ± 1.3 μ g/L Go, 3.9 ± 0.6 μ g/L MGo and 8.1 ± 1.2 μ g/L DMGo, based on triplicate analysis. These results demonstrate that sugar degradation to α -ketoaldehydes during analytical procedure was negligible; however, these results also indicate that glucose and/or fructose reagents contain considerable amounts of small dicarbonyl compounds or become contaminated during preparation/storage, so a clean-up step is mandatory, in

order to avoid positive systematic errors, in agreement with our previous work (Gomez Ojeda et al., 2014).

In the application of RP-HPLC-FLD, the separation of four compounds was achieved within 12 min. The detection and quantification limits (*DL*, *QL*) were evaluated based on signal-to-noise ratio; the criteria of six and ten standard deviations were adopted for *DL* and for *QL*, respectively, using the signal obtained for the lowest calibration standard (ICH, 2012). The calibration *DL* and *QL* were in the range 0.3–0.5 µg/L and 0.5–0.8 µg/L for the three compounds (Gomez Ojeda et al., 2014). To evaluate method *DL* and *QL*, the standard fructose + glucose solution mentioned above was used as a blank (after SPE clean-up step) and the obtained values for *DL* were 0.07 mg/kg Go, 0.06 mg/kg MGo, 0.05 mg/kg DMGo and for *QL* the values were: 0.11 mg/kg Go, 0.10 mg/kg MGo, 0.09 mg/kg DMGo. In Fig. 1, typical chromatograms obtained for agave syrup (A1) and bee honey (H1), and for these same samples after standard addition are presented. The recovery values calculated based on these experiments are given in Table 1; specifically, the values obtained for Go (94.0–99.5%), MGo (98–99.5%) and DMGo (102–106%) are indicative of acceptable accuracy.

In Table 2, results obtained in the analysis of eight HFASs, three bee honeys and three high fructose corn syrups are presented. As can be observed, agave syrups contained significantly higher concentrations of the three α -ketoaldehydes as compared to other products (unpaired *t*-test, *p* < 0.05). In particular, MGo concentrations were in the range 15.6–315 mg/kg (mean 102 ± 91 mg/kg, median 88.4 mg/kg), which means on average about 25 times higher than the concentrations found in randomly selected Mexican commercial bee honey (3.04–4.90 mg/kg, Table 2). Since all HFASs were elaborated from *A. Tequilana*, relatively wide range of MGo concentrations in these products suggests important differ-

ences in the production process applied by individual manufacturers and also supports that this compound is formed during the Maillard reaction. It is worth noting that Go and MGo concentrations determined in bee honey (Table 2) were within the range of previously reported values (Go from not detectable up to 10.9 mg/kg; MGo from not detectable up to 5.7 mg/kg, (Arena et al., 2011; Mavric et al., 2008; White, 2009)), which confirms the consistency of our analytical data. As showed in Table 2, corn syrups contained the lowest concentrations of the three compounds, also in agreement with the earlier studies (0.18–0.51 mg/kg Go and 1.1–3.8 mg/kg MGo, (White, 2009)); though more elevated concentrations of MGo (up to 10.88 mg/kg) have been recently reported (Gensberger et al., 2012). In any case, significantly lower MGo levels found in this work in high fructose corn syrups as compared to agave products indicate the importance of the plant type and calls for further investigation of possible sources of MGo in agave syrups elaborated from *A. Tequilana*. The determination of diacetyl has not been undertaken before; our data demonstrate its presence at low concentrations in all samples, which excludes the application of this compound as internal standard. Since diacetyl is often used as a flavour food additive, we included in Table 2 the results for non-aromatised products. Additionally, two commercial corn syrups of vanilla and maple flavours were also analysed, showing more elevated concentrations of diacetyl (up to 12.4 mg/kg).

The well-known bactericidal properties of bee honey have been associated with several chemical factors, such as high sugar concentration, generation of hydrogen peroxide, low pH and also with the presence of methylglyoxal (Kwakman & Zaat, 2012; Lu et al., 2013). Since relatively elevated MGo concentrations were found in agave syrups, it seemed interesting to measure their antibacterial activity. It should be emphasised that this particular aspect has not been approached before, despite many health benefits of agave plant and its derived products reported in the scientific literature (Ahumada-Santos et al., 2013; Santos-Zea et al., 2012). Taking into account the abovementioned variables contributing to antimicrobial activity of honey bee, in the first place possible generation of hydrogen peroxide was examined in HFASs.

3.2. Hydrogen peroxide assay

The Amplex Red[®] kit measures enzymatically catalysed oxidation of non-fluorescent substrate to highly fluorescent resorufin by hydrogen peroxide and this kit was applied in the present work. For standard H₂O₂ solutions at different concentrations, it was observed that the reaction was completed after 5 min and afterwards the fluorescence signal was stable for at least 25 min, which allowed us to measure the liberation rate of hydrogen peroxide in the diluted sample between 5 and 25 min (typical calibration curve, stability of fluorescence signals and results of H₂O₂ production in A1, A4, H1 are shown in Fig. 1S in Supplementary Material). The dilution factor (10:1) was applied based on previous studies (Brudzynski et al., 2012). In Table 3, the results obtained are summarised. For all samples, acceptable linearity of increasing fluorescence signal during a course of H₂O₂ production was obtained (*R*² > 0.977); based on the slope values, the results in mM of H₂O₂ per hour were calculated. For the three bee honeys, the results 0.49–0.58 mM/h were in agreement with other reports (Oelschlaegel et al., 2012b). In agave syrups, the liberation of hydrogen peroxide was also observed, yet at lower rates, except for the A2 sample (Table 3). These results indicate the involvement of enzymatic activity and also suggest that H₂O₂ may contribute to bacteriostatic properties of diluted HFASs. Sugar profiles in the two types of products were evaluated by gas chromatography with flame ionisation detector (typical chromatogram shown in Fig. 2S, Supplementary Material) and, as expected, fructose was

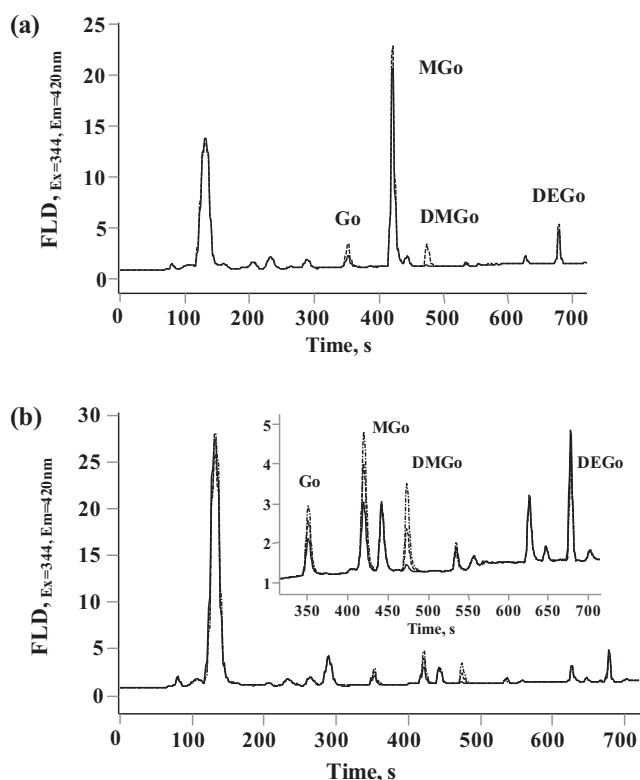


Fig. 1. Typical RP-HPLC-FLD chromatograms (500 µg/L DEGo as internal standard): (a) Agave syrup A1 (—) and this same sample after standard addition (2.0 mg/kg of each compound) (---); quantitative results given in Table 1. (b) Bee honey H1 (—) and this same sample after two point standard addition: (---) 1.0 mg/kg and (.....) 2.0 mg/kg Go, Mgo, DMGo added. Internal standard (500 µg/l DEGo); the results given in Table 1.

Table 1
Results of the recovery experiments; mean values for triplicate analysis are given with respective standard deviations.

Analyte added (mg/kg)	Glyoxal		Methylglyoxal		Diacetyl	
	Mean ± SD (mg/kg)	Recovery (%)	Mean ± SD (mg/kg)	Recovery (%)	Mean ± SD (mg/kg)	Recovery (%)
<i>Bee honey (H1)</i>						
0	1.91 ± 0.12	–	3.04 ± 0.18	–	0.32 ± 0.05	–
1.0	2.85 ± 0.09	94.0	4.02 ± 0.20	98.2	1.37 ± 0.11	105
2.0	3.87 ± 0.14	98.2	5.03 ± 0.28	99.5	2.38 ± 0.18	103
<i>Agave syrup (A1)</i>						
0	2.20 ± 0.12	–	39.5 ± 2.6	–	0.40 ± 0.09	–
1.0*	3.18 ± 0.18	98.0	49.4 ± 3.1*	98.8	1.42 ± 0.10	102
2.0*	4.19 ± 0.15	99.5	59.1 ± 3.9*	98.0	2.52 ± 0.16	106

* MGo determined in a separate run, after standard addition corresponding to 10 and 20 mg/kg in the syrup.

Table 2
Results obtained for glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in agave syrups, bee honey and corn syrups (same letters indicate statistically significant difference between analyte concentrations in two product types, as evaluated by unpaired *t* test, $p < 0.05$).

Sample	Glyoxal (mg/kg ± SD)		Methylglyoxal (mg/kg ± SD)		Diacetyl (mg/kg ± SD)	
	Individual	Mean	Individual	Mean	Individual	Mean
<i>High fructose agave syrups</i>						
A1	2.20 ± 0.12	2.28 ± 0.35 (a, b)	39.5 ± 2.6	102 ± 91 (d, e)	0.40 ± 0.09	2.05 ± 2.05 (g, h)
A2	1.90 ± 0.08		67.3 ± 3.1		2.02 ± 0.05	
A3	2.21 ± 0.05		315 ± 12		2.70 ± 0.09	
A4	2.40 ± 0.11		15.6 ± 1.2		0.73 ± 0.04	
A5	2.60 ± 0.05		108 ± 7.2		2.13 ± 0.09	
A6	2.14 ± 0.10		92.4 ± 3.8		0.86 ± 0.03	
A7	1.86 ± 0.05		90.6 ± 2.9		0.84 ± 0.06	
A8	2.92 ± 0.09		86.1 ± 4.3		6.71 ± 0.92	
<i>Bee honeys</i>						
H1	1.91 ± 0.12	1.55 ± 0.31 (a, c)	3.04 ± 0.18	4.25 ± 1.05 (d, f)	0.32 ± 0.05	0.58 ± 0.23 (g)
H2	1.40 ± 0.07		4.90 ± 0.32		0.73 ± 0.06	
H3	1.34 ± 0.14		4.80 ± 0.36		0.69 ± 0.04	
<i>High fructose corn syrups</i>						
C1	0.63 ± 0.05	0.62 ± 0.09 (b, c)	1.57 ± 0.03	1.70 ± 0.14 (e, f)	0.59 ± 0.04	0.47 ± 0.11 (h)
C2	0.71 ± 0.03		1.84 ± 0.02		0.43 ± 0.02	
C3	0.53 ± 0.04		1.69 ± 0.03		0.38 ± 0.02	

Table 3
Results of the hydrogen peroxide assay in agave syrups and bee honey samples.

Sample	R ²	Slope	H ₂ O ₂ (mM/h)
A1	0.9947	0.18	0.22
A2	0.9924	1.14	1.37
A3	0.9981	0.45	0.54
A4	0.9777	0.11	0.14
A5	0.9795	0.31	0.37
A6	0.9987	0.21	0.25
A7	0.9996	0.17	0.22
A8	0.9789	0.23	0.27
H1	0.9897	0.41	0.49
H2	0.9889	0.47	0.57
H3	0.9937	0.28	0.58

found as a primary sugar in agave syrups, whereas in bee honey glucose was prevalent. Furthermore, gluconic acid was found in honey but not in agave syrups; which excludes the system glucose/glucose oxidase as a source of hydrogen peroxide in the latter. It seems possible that other plant enzymes might participate in H₂O₂ production and activity of enzymes from microorganisms used to obtain inulinases for non-thermal hydrolysis of fructans should also be considered (García-Aguirre et al., 2009; Waleckx et al., 2011).

3.3. Antibacterial activity assay

A broth dilution spectrophotometric assay was carried out as described in *Materials and Methods*. The two microorganisms tested

were Gram-positive *B. subtilis* 168 and Gram-negative *E. coli* DH5. Both of them are ubiquitous organisms and have been utilised previously in antibacterial testing of honey, other food-related products and also in the context of wound healing (Boorm et al., 2010; Kwakman et al., 2008; Kwakman et al., 2012; Tan et al., 2009). In Fig. 2, effect of sample dilution on the percentage of growth inhibition is presented for the two bacteria strains (Fig. 2a, b – *E. coli*; Fig. 2c, d – *B. subtilis*). The detailed results are presented in Table 1S in Supplementary Material. Even though hydrogen peroxide generation upon dilution was less pronounced in HFASs as compared to bee honey (Table 3); catalase was used to compare bacteriostatic activity without and with inactivation of hydrogen peroxide generation (Fig. 2a and c and Fig. 2b and d, respectively and also Table 1S). As can be observed, all syrups and bee honey presented similar activity against two strains tested; the strongest inhibition corresponded to agave syrups A3, A6, A7, A8 that contained relatively high MGo concentrations (Table 2). Furthermore, for these four products, catalase addition had minimum effect on the growth inhibition. On the other hand, agave syrups A1 and A4 with the lowest MGo concentrations presented relatively weak growth inhibition for the two bacteria and catalase addition caused a decrease of this inhibition. For other HFASs (A2, A5), the results were very similar to those obtained for bee honey H1; growth inhibition was detected at sample concentration 12.5% (w/v) and decreased after catalase addition. As expected, for the concentration 50% (w/v) all examined products totally inhibited bacteria growth, because of their high sugar content and high viscosity. The minimum inhibiting concentrations evaluated were 50% for A4; 25% for A1, A2, A5, A6, A7, A8, H1; and 12.5% for A3. These

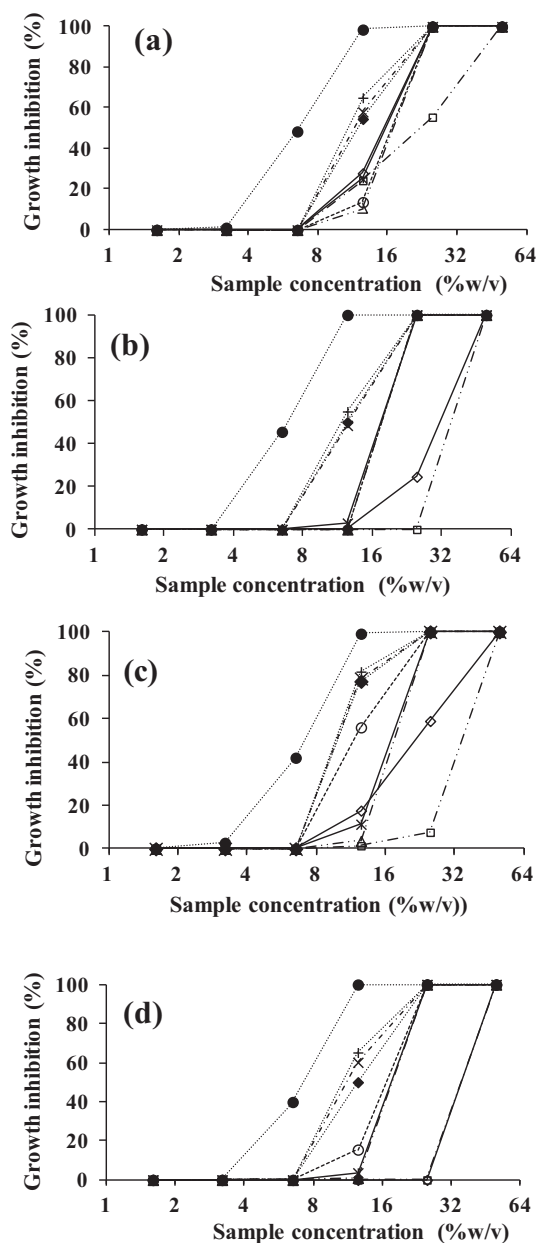


Fig. 2. Results obtained in a broth dilution spectrophotometric assay of antimicrobial activity: (—◇—) A1; (—△—) A2; (—●—) A3; (—□—) A4; (—○—) A5; (—▲—) A6; (—×—) A7; (—◆—) A8; (—*—) H1. (a) *E. coli*; (b) *E. coli* with catalase; (c) *B. subtilis*; (d) *B. subtilis* with catalase.

results suggest that high MGo concentration might contribute to the non-peroxide bacteriostatic activity of agave syrups (Fig. 2, Table 2).

3.4. Principal component analysis

To discover possible relationships among parameters measured and to reveal which of these parameters might be responsible for the inhibition of bacteria growth under exposure to agave syrups, principal component analysis (PCA) was applied, using the data matrix corresponding to A1–A8 and H1 samples (Table 2, Fig. 2, Table 1S). Initially, the following variables were considered: Go, MGo, DMGo concentrations and percentage of growth inhibition observed for each bacteria strain at sample dilutions in the range 1.6–25%, in the absence and in the presence of catalase; however PCA model obtained was not statistically meaningful (less than

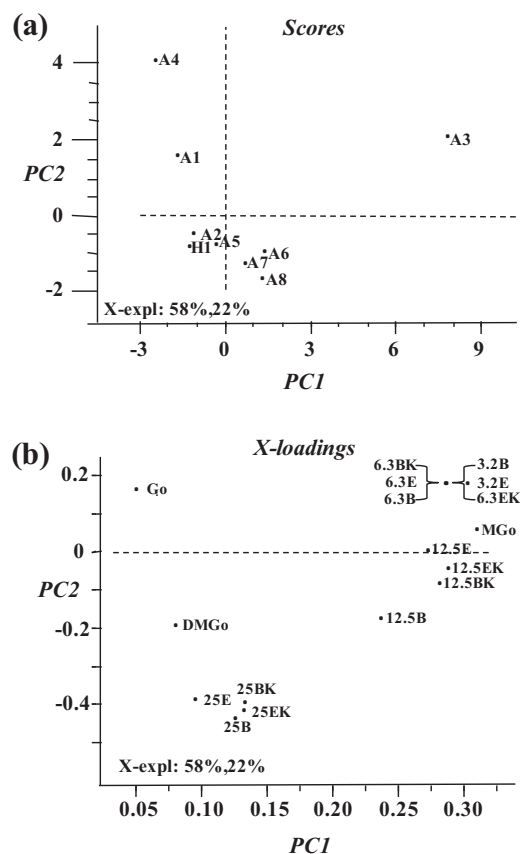


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of data obtained in the analysis of agave syrups (A1–A8) and bee honey H1: (a) scores plot showing the distribution of samples and (b) X-loadings plot showing distribution of variables (3.2B, 6.3B, 12.5B, 25B – growth inhibition found for respective concentrations of syrups in *B. subtilis* cultures; 6.3BK, 12.5BK, 25BK – *B. subtilis* cultures with catalase; 3.2E, 6.3E, 12.5E, 25E – *E. coli* growth inhibition at different syrup concentrations; 6.3EK, 12.5EK, 25EK – these same *E. coli* samples with catalase).

35% of total data variability described by the two first PCs) and eigenvalues for the growth inhibition at low (1.6%) syrup concentrations were below 0.08, so these variables were eliminated. In the second model, the first two principal components accounted for 80% of total data variability (Fig. 3). On the scores plot (Fig. 3a) the distribution of samples in a space of reduced dimensionality (PC1, PC2 coordinates) shows two clusters: (1) bee honey H1, agave syrups A2, A5–A8 and (2) agave syrups A1, A4; whereas A3 sample with the highest MGo concentration is clearly separated from all other samples. The first principal component (PC1) is apparently related to the MGo concentration, since it separates A3, A5–A8 syrups with high concentrations of this compound, from A1, A2, A4 and H1 samples with significantly lower MGo concentrations. Most importantly, PCA detected close association of MGo with inhibition of bacterial growth, as can be observed on the X-loading plot (Fig. 3b). Specifically, PC1 eigenvalues for MGo and for variables corresponding to the growth inhibition of *B. subtilis* and *E. coli* at syrup concentrations 3.2–12.5%, in the absence and in the presence of catalase, were higher than 0.23 (variables 3.2B, 6.3B, 6.3BK, 12.5B, 12.5BK and 3.2E, 6.3E, 6.3EK, 12.5E, 12.5EK, respectively in Fig. 3b). Overall, PCA results clearly indicate that MGo contained in agave syrups is at least in part responsible for non-peroxide bacteriostatic activity of these products.

4. Conclusions

In this work, the determination of small α -ketoaldehydes in high fructose agave syrups is reported for the first time. In the

application of previously proposed RP-HPLC-FLD procedure, the method quantification limits were 0.11 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.09 mg/kg for Go, MGo and DMGo, respectively. The results obtained indicate elevated concentrations of methylglyoxal in HFASs as compared to the randomly selected Mexican commercial bee honeys and corn syrups. Hydrogen peroxide generation upon dilution was detected in all HFASs, yet it was less pronounced as compared to the bee honey. All agave syrups presented bacteriostatic activity against *B. subtilis* and *E. coli* in a broth dilution spectrophotometric assay and catalase addition had minimum effect on the assay results, especially in syrups with relatively elevated MGo concentration. Principal component analysis revealed direct association between inhibition of bacterial growth and MGo for the two bacteria strains, independently of the inactivation of hydrogen peroxide generation. It is concluded that elevated concentration of MGo in high fructose agave syrups is at least in part responsible for non-peroxide bacteriostatic activity of these products. The primary importance of our finding is the potential toxicity of α -ketoaldehydes; on the other hand, antimicrobial activity of HFASs seems to be relevant in terms of their possible future applications for therapeutic purposes. Further studies are needed to provide more experimental evidence and to clarify what is the origin of MGo and of hydrogen peroxide generation in agave syrups.

Acknowledgment

The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), projects 178553 and 187749, is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.140>.

References

- Agila, A., & Barringer, S. (2013). Effect of adulteration versus storage on volatiles in unifloral honeys from different floral sources and locations. *Journal of Food Science*, 78, C184–C191.
- Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M. J., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., et al. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 49, 143–149.
- Amoroso, A., Maga, G., & Daglia, M. (2013). Cytotoxicity of alpha-dicarbonyl compounds submitted to in vitro simulated digestion process. *Food Chemistry*, 140, 654–659.
- Arena, E., Ballistreri, G., Tomaselli, F., & Fallico, B. (2011). Survey of 1,2-dicarbonyl compounds in commercial honey of different floral origin. *Journal of Food Science*, 76(8), C1203–C1210.
- Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1534–1543.
- Brudzinski, K., Abubaker, K., & Miotto, D. (2012). Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H2O2-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry*, 133, 329–336.
- Degen, J., Vogel, M., Richter, D., Hellwig, M., & Henle, T. (2013). Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10253–10260.
- García-Aguirre, M., Saenz-Alvaro, V. A., Rodríguez-Soto, M. A., Vicente-Magueyual, F. J., Botello-Alvarez, E., Jimenez-Islas, H., et al. (2009). Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10205–10210.
- Gensberger, S., Mittelmayer, S., Glomb, M. A., & Pischetsrieder, M. (2012). Identification and quantification of six major α -dicarbonyl process contaminants in high-fructose corn syrup. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2923–2931.
- Gomez Ojeda, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., Garay-Sevilla, M. E., & Wrobel, K. (2014). HPLC determination of glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent. *Analytical Biochemistry*, 444, 52–58.
- ICH. (2012). ICH harmonized tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1). <http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>.
- Irish, J., Blair, S., & Carter, D. A. (2011). The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS ONE*, 6, e18229.
- Jones, J. M. (2009). Dietary sweeteners containing fructose: Overview of a workshop on the state of the science. *Journal of Nutrition*, 139, 1210S–1213S.
- Kilty, S. J., Duval, M., Chan, F. T., Ferris, W., & Slinger, R. (2011). Methylglyoxal: (active agent of manuka honey) In vitro activity against bacterial biofilms. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 1, 348–350.
- Kovacic, P., & Cooksy, A. L. (2005). Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Archives of Toxicology*, 79, 123–128.
- Kovacic, P., & Somanathan, R. (2011). Cell signaling and receptors in toxicity of advanced glycation end products (AGEs): Alpha-dicarbonyls, radicals, oxidative stress and antioxidants. *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*, 31, 332–339.
- Kwakman, P. H. S., Van den Akker, J. P. C., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J. M., de Boer, L., et al. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clinical Infection Diseases*, 46, 1677–1682.
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64, 48–55.
- Lachenmeier, D. W., Sohnius, E. M., Atting, R., & Lopez-Mercedes, G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3911–3915.
- Lo, C. Y., Li, S., Wang, Y., Tan, D., Pan, M. H., Sang, S., et al. (2008). Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup. *Food Chemistry*, 107, 1099–1105.
- Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7835–7840.
- Lu, J., Carter, D. A., Turnbull, L., Rosendale, D., Hedderley, D., Stephens, J., et al. (2013). The effect of New Zealand kanuka, manuka and clover honeys on bacterial growth dynamics and cellular morphology varies according to the species. *PLoS ONE*, 8, e55898.
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 483–489.
- NMX-FF-110-SCFI-2008.(2008). Diario Oficial de la Federación Mexicana, Norma Mexicana. Productos alimenticios. Jarabe de agave. Especificaciones y metodos de prueba.
- Oelschlaegel, S., Gruner, M., Wang, P. N., Boettcher, A., Koelling-Speer, I., & Speer, K. (2012a). Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7229–7237.
- Oelschlaegel, S., Pieper, L., Staufenbiel, R., Gruner, M., Zeppert, L., Pieper, B., et al. (2012b). Floral markers of cornflower (*Centaurea cyanus*) honey and its peroxide antibacterial activity for an alternative treatment of digital dermatitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11811–11820.
- Papetti, A., Mascherpa, D., Marrubini, G., & Gazzani, G. (2013). Effect of in vitro digestion on free alpha-dicarbonyl compounds in balsamic vinegars. *Journal of Food Science*, 78, C514–C519.
- Patton, T., Barret, J., Brennan, J., & Moran, N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiol Methods*, 64, 84–95.
- Ruisinger, B., & Schieberle, P. (2012). Characterization of the key aroma compounds in rape honey by means of the molecular sensory science concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4186–4194.
- Santos-Zea, L., Leal-Diaz, A. M., Cortes-Ceballos, E., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8, 218–231.
- Tan, H. T., Rahman, R. A., Gan, S. H., Halim, A. S., Hassan, S. A., Sulaiman, S. A., et al. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 9, 34.
- Walecx, E., Gschaendler, A., Colonna-Ceccaldi, B., & Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108, 40–48.
- Walecx, E., Mateos-Dias, J. C., Gschaendler, A., Colonna-Ceccaldi, B., Brin, N., García-Quezada, G., et al. (2011). Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production. *Food Chemistry*, 124, 1533–1542.
- Wang, Y., & Ho, C. T. (2012). Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal. *Chemical Society Reviews*, 41, 4140–4149.
- White, J. S. (2009). Misconceptions about high-fructose corn syrup: Is it uniquely responsible for obesity, reactive dicarbonyl compounds, and advanced glycation end products? *Journal of Nutrition*, 139, 1219S–1227S.
- Willems, J. L., & Low, N. H. (2012). Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8745–8754.

**Methylglyoxal is associated with bacteriostatic activity
of high fructose agave syrups**

**Alma Rosa Corrales Escobosa, Armando Gomez Ojeda, Kazimierz
Wrobel, Armando Alcazar Magana, Katarzyna Wrobel***

Chemistry Department, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato,
Mexico

Fig.1S. Results of hydrogen peroxide assay:

(a) calibration curve;

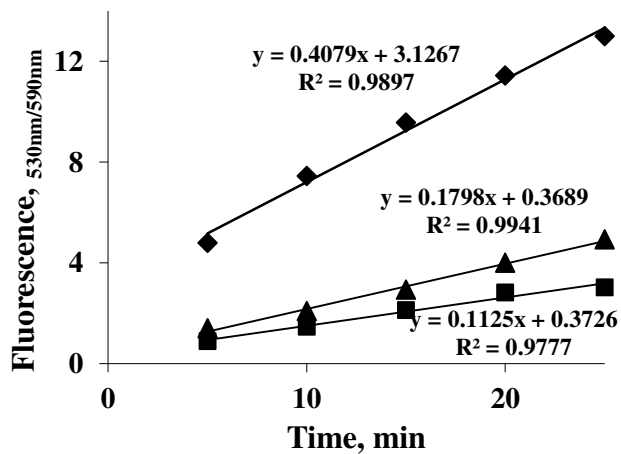
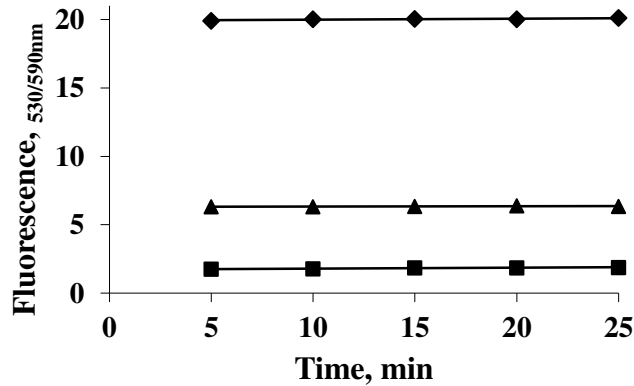
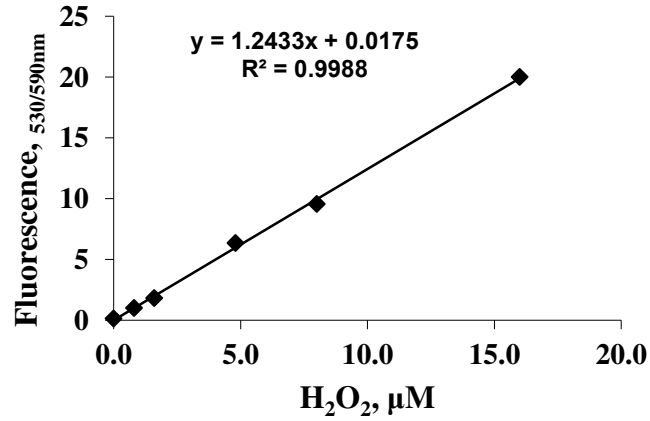
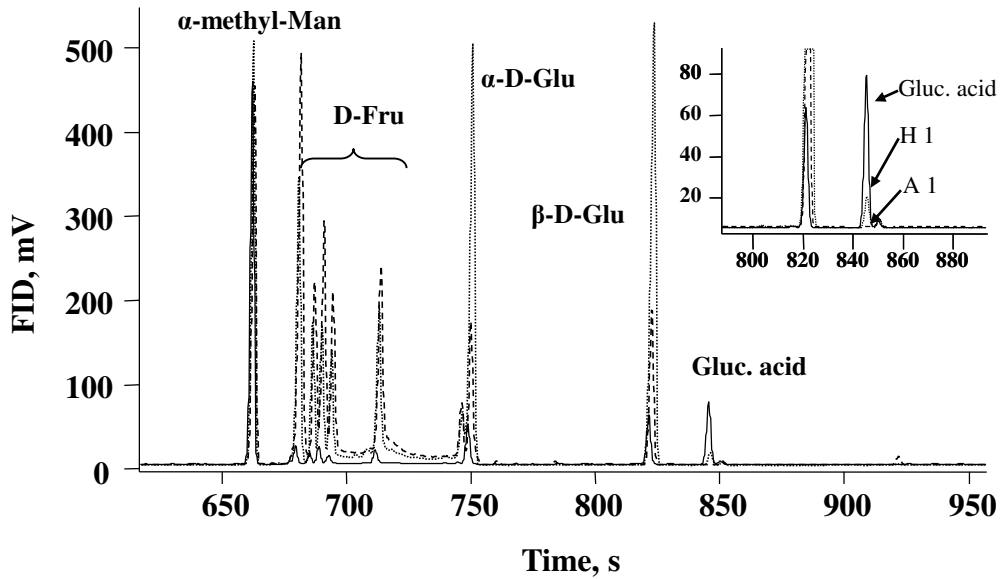
(b) stability of the fluorescence signals in standard H_2O_2 solutions (0.5; 5.0; 15 μM);(c) analysis of real samples: \blacksquare - A4; \blacktriangle - A1; \blacklozenge - H1

Fig.2S. Typical GC-FID chromatograms showing sugar profiles in bee honey H1 (····) and in agave syrup A1 (---); standard mix. 1mg/mL (—).



- The mixed standard solution contained: D-Fructose, D- Glucose, Gluconic acid.
- α -methylmannoside was used as internal standard.
- Analysis accomplished after pre-column derivatization with BSTFA (Clarus 500, Perkin Elmer).

Fast determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography without pre-column derivatization

Determinación rápida de glucosamina en formulaciones farmacéuticas mediante cromatografía líquida de alta resolución sin derivatización pre-columna

Armando Alcázar Magaña*, Katarzyna Wrobel*, Alma Rosa Corrales Escobosa*, Kazimierz Wrobel*

ABSTRACT

The goal of this work was to achieve fast determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography. Commercial tablets were dissolved in water and after filtration, 6 μ L were injected to Luna C18 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m). Diode Array Detector (DAD) was set at 193 nm. Using sodium perchlorate (50 mM, pH 6.5): acetonitrile (99:1, v/v) at 0.8 mL min⁻¹ as a mobile phase, glucosamine eluted with the retention time 2.834 min \pm 0.003 min and the peak purity in real sample was 998.9 \pm 3.3. The detection limits evaluated for peak height and peak area measurements were 0.05 μ g mL⁻¹ and 0.02 μ g mL⁻¹, respectively. The between-day precision relative standard deviation (RSD) evaluated at two concentration levels was always below 1%.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue lograr la determinación rápida de glucosamina en formulaciones farmacéuticas mediante cromatografía líquida de alta resolución. Las tabletas comerciales se disolvieron en agua y después de filtración la solución (6 μ L) fue introducida en la columna Luna C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m). La detección UV se llevó a cabo en 193 nm. La fase móvil fue perclorato de sodio (50 mM, pH 6.5): acetonitrilo (99:1, v/v) con el flujo total de 0.8 mL min⁻¹. En estas condiciones, el tiempo de retención fue 2.834 min \pm 0.003 min con la pureza de pico en la muestra real de 998.9 \pm 3.3. Los límites de detección evaluados para altura y área del pico fueron 0.05 μ g mL⁻¹ y 0.02 μ g mL⁻¹, respectivamente. La precisión evaluada para dos niveles de concentración con una desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) fue siempre inferior al 1%.

Recibido: 31 de enero de 2014
 Aceptado: 12 de febrero de 2014

Keywords:

Glucosamine; pharmaceutical formulations; reversed phase liquid chromatography.

Palabras clave:

Glucosamina; formulaciones farmacéuticas; cromatografía de líquidos.

Cómo citar:

Alcázar Magaña, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R. & Wrobel, K. (2014). Fast determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography without pre-column derivatization. *Acta Universitaria*, 24(NE-2), 16-22. doi: 10.15174/au.2014.717

INTRODUCTION

An amino monosaccharide glucosamine (2-amino-2-deoxyglucose) is widely used in the treatment of degenerative joint diseases (Chiusaroli *et al.*, 2011; Distler & Anguelouch, 2006; Ragle & Sawitzke, 2012). It has also been accepted as a dietary supplement by the US Food and Drug Administration; however its effectivity is now under discussion (Vlad, LaValley, McAlindon & Felson, 2007). The natural source of glucosamine is chitin, typically obtained from sea shrimp and crab shells (López-Cervantes, Sánchez-Machado & Delgado-Rosas, 2007; Zhu, Cai, Yang & Su, 2005). The production of pharmaceuticals and dietary supplements involves the liberation of glucosamine from chitin by means of acid hydrolysis; poor control of glucosamine content in commercial products has been highlighted as an important cause of inconsistent outcomes in clinical trials (Aghazadeh-Habashi & Jamali, 2011). In this regard, analytical control of glucosamine in the commercial products becomes an issue. Several procedures are available for this purpose, including

* Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Lascuráin de Retana 5, Guanajuato, Gto., México, C.P. 36000. Phone: (473) 7327555. E-mail: kazimier@ugto.mx

simple spectrophotometric assays (Gaonkar, Khanvilkar, Shettigar & Gadgoli, 2006), thin layer chromatography (Solomon, Kumar, Anand, Sivakumar & Venkatnarayanan, 2010), liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE) separations with spectrophotometric, contactless conductivity, amperometric or fluorimetric detection (Ander, Karlsson & Ohrlund, 2001; Campo, Campo, Ferlazzo, Vinci & Calatroni, 2001; Chaisuwan *et al.*, 2011; Cheng & Kaplan, 2003; Qi, Zhang, Zuo & Chen, 2006; Soga & Heiger, 1998). Among various studies reported previously, the most common approach relies of suitable derivatization followed by LC separation with spectrophotometric or spectrofluorimetric detection (Anumula, 1994; Cohen & De Antonis, 1994; Domínguez & Dunn, 1987; Eikenes, Fongen, Roed & Stenstrøm, 2005; Liang, Leslie, Adebawale, Ashraf & Eddington, 1999; Palace & Phoebe, 1997; Yu, Cai, Zuo & Duan, 2005; Zhou, Waszkuc & Mohammed, 2004; 2005; Zhu *et al.*, 2005). The derivatization agents used so far have been: *o*-phtaldialdehyde (OPA) (Eikenes *et al.*, 2005; Nemati, Valizadeh, Ansarin & Ghaderi, 2007) 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl) (Zhu *et al.*, 2005), 9-fluorenylmethyl-chloroformate (López-Cervantes *et al.*, 2007), *N*-(9-fluorenyl-methoxycarbonyloxy) succinimide (Fmoc-Su) (Zhou, Waszkuc & Mohammed, 2004; 2005), dansyl chloride (Qi *et al.*, 2006) 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (Cohen & De Antonis, 1994; Palace & Phoebe, 1997), 2-aminobenzoic acid (Anumula, 1994) and phenylisothiocyanate (Liang *et al.*, 1999). Even though pre-column derivatization enables for enhanced selectivity and sensitivity of determination, it requires additional procedural steps and makes the whole procedure less attractive for routine analytical applications. To meet the desired simplicity and speed, the direct chromatographic method has been proposed by Shao, Alluri, Mummert, Koetter & Lech (2004). In that work however, the separation of glucosamine was achieved on the specific amine column and the separation time was 15 min.

In the present study, the direct determination of glucosamine has been undertaken, aiming the development of a new, simple and fast reversed phase chromatographic procedure, suitable for routine analytical control of glucosamine-based pharmaceutical formulations.

MATERIAL AND METHODS

Instrumentation

An Agilent Series 1200 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, well plate autosampler,

a diode array detector and Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic column was Luna C18 (250 mm × 4.6 mm, 5µm) from Phenomenex.

Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA), HPLC grade acetonitrile and methanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) were used throughout. D-(+)-Glucosamine hydrochloride (99.9% purity) from Sigma was used as a standard. The following Sigma reagents were used: hydrochloric acid, perchloric acid, boric acid, sodium hydroxide, sodium acetate and *o*-phthalaldehyde (OPA). Three commercial pharmaceutical formulations were purchased in the local market.

Procedures

Standard/sample preparation

A stock solution of glucosamine was prepared by weighing precisely 900 mg of the Sigma reagent and dissolving in 100 mL of deionized water (ultrasonication for 15 min). Working solution corresponding to the highest calibration standard (0.9 mg mL⁻¹) was prepared daily by appropriate dilution. For each pharmaceutical product, 25 tablets were weighed and ground in porcelain mortar. Five aliquots corresponding to the average mass of one tablet were precisely weighed and transferred into a volumetric flasks. For better solubilization, each suspension was ultrasonicated (10 min) and the volume was brought to 100 mL with deionized water. The samples were centrifuged (10000 g, 10 min), diluted 1:10 (v/v) with the mobile phase and introduced into the HPLC autosampler vials.

Reversed phase separation without pre-column derivatization

Isocratic elution was carried out with the mobile phase composed of sodium perchlorate (50 mM perchloric acid adjusted to pH 6.5 with 1 M sodium hydroxide) – acetonitrile (99:1, v/v) at a flow rate 0.8 mL min⁻¹. The UV detection was at 193 nm (bandwidth 6 nm) and the injection volume 6 µL. The column was thermostated (20 °C), the chromatographic run was set at 4 min and the next injection was performed with no need for column cleaning and equilibration. The calibration was performed in automatic mode, setting the concentrations at 0 mg mL⁻¹; 0.15 mg mL⁻¹; 0.30 mg mL⁻¹; 0.60 mg mL⁻¹; 0.90 mg mL⁻¹. For recovery experiments, the samples were spiked also in automatic mode. In

brief, the sample volume was set at 6 μL , then 0 μL , 4 μL and 8 μL of standard solution (0.5 mg mL^{-1}) were added, the volume was brought to 20 μL with the mobile phase and injected.

Reversed phase separation after OPA derivatization

The derivatization of glucosamine in the calibration solutions and in the real samples was performed in the automatic mode. The following steps were programmed: (1) draw 5 μL of borate buffer (0.4 M, pH 10); (2) draw 5 μL of methanolic OPA solution (40 mM); (3) wash needle, 1 s; (4) draw 6 μL of sample (or calibration solution); (5) draw mobile phase to complete 20 μL ; (6) mix in washport, 6 times at maximum speed; (7) needle wash in the flush port, 1 s; (8) wait 2 min and (9) inject. The mobile phases A – acetonitrile, B – methanol, C – sodium acetate (30 mM, pH 7.0) were used in the following gradient: 0 min 15% A, 5% B, 40% C; 7.0 min 50% A, 5% B, 15% C; 7.5 min 70% A, 5% B, 15% C; 8.5 min 40% A, 5% B, 20% C; 9.5 min 15% A, 5% B, 40% C. Total flow rate was 0.8 mL min^{-1} , column was thermostated at 30 $^{\circ}\text{C}$ and the UV detection was at 340 nm. The calibration range and the sample preparation was the same as in the procedure without derivatization.

Statistical analysis

Descriptive statistics was performed to obtain means and standard deviations. To detect possible differences between the results obtained by two chromatographic procedures, ANOVA (Analysis of variance) was carried out using Statistica for Windows software (StatSoft Inc, Tulsa, OK). Significance level was established at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic determination of non-derivatized glucosamine by reversed phase chromatography with spectrophotometric detection is hampered by its high polarity and the lack of absorption band in visible wavelength range; however this particular approach would be quite attractive for routine analytical applications. In this work, several buffering and/or ion-pairing reagents have been examined as components of the mobile phase in order to achieve acceptable retention of glucosamine on typical analytical column (Luna C18). Specifically, phosphate, borate and acetate sodium or ammonium salts, heptafluorobutyric acid and sodium perchlorate in the range of pH from 3.0 to 7.5 were examined. The effect of the mobile phase ionic strength has also been explored, using the concentration range

of the above salts from 10 mM up to 50 mM. The proportion between aqueous solution and organic modifier (acetonitrile) has been tested from 99.5:0.5 to 95:5 (v/v). Finally, the flow rate has been varied in the range 0.5 mL min^{-1} -1.5 mL min^{-1} . In each case, the selection criterions were: short retention time of glucosamine with acceptable capacity factor and high peak purity. The conditions finally selected are presented in Materials and methods.

Considering the absorption spectrum of glucosamine in UV region, the detection wavelengths 193 nm, 196 nm and 200 nm were tested, varying the bandwidth in the range 6 nm to 20 nm. With the selection criterion of possible high signal-to-noise ratio, the analytical wavelength 193 nm and bandwidth 6 nm were taken for further work. The injection volume was 6 μL and the column was thermostated (20 $^{\circ}\text{C}$).

The analytical parameters evaluated for this procedure are summarized in table 1 and the chromatograms obtained in the analysis of real sample and this same sample after standard addition are presented in figure 1a. As can be observed, the retention time of glucosamine was 2.834 min (dead volume at 1.65 min) with acceptable reproducibility as demonstrated by low relative standard deviation (RSD) obtained for 10 non-successive injections performed during one week (RSD < 0.1%). Owing to the simple chemical composition of glucosamine-based pharmaceutical formulations, the capacity factor 0.72 was considered acceptable. The peak purity measured between 2.78 min and 2.88 min was 999.1 ± 3.0 and 998.9 ± 3.3 , for the standard solution and for the real sample respectively.

Calibration solutions were prepared to cover concentration range expected in ten times diluted solutions of pharmaceutical formulations; linear regression function was obtained with $r^2 = 0.9998$, indicating good linearity (table 1). Within-day and between-day precisions presented in table 1 were evaluated as relative standard deviation for 10 successive measurements and as RSD for 10 measurements performed during one week, respectively. The replicate measurements were carried out using standard solutions 0.1 mg mL^{-1} and 0.9 mg mL^{-1} , each of them prepared daily from this same stock glucosamine standard (9 mg mL^{-1}). Slightly better precision was obtained for peak height measurements, so this signal mode could be used for routine applications. It should be noted that the analytical performance achieved in this simple chromatographic procedure, especially in terms of detection limit, precision and short time of analytical run, are comparable to those recently reported for capillary

electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector (DL = 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, RSD < 1.9% and 3 min run time) (Campo, Campo, Ferlazzo, Vinci & Calatroni, 2001).

To examine stability of sample solution, similar repetitive measurements were carried out during one week, while keeping the sample at 4 °C. For the peak height signal mode, the RSD value obtained for sample solution containing 0.1 mg mL⁻¹ was 1.14% as compared to 0.96%

evaluated for glucosamine standard solution at this same concentration. These results confirm good stability of both, sample and calibration solutions over at least one week period of time. For recovery checking, glucosamine standard was added to the sample solution, as described in Materials and methods. Doing so, the concentrations of standard added in the final solution were 0.1 mg mL⁻¹ and 0.2 mg mL⁻¹; as presented in tables 1 and 2, practically complete recovery was obtained in each case both, for peak height and peak area signal modes.

Table 1. Analytical parameters evaluated for the proposed procedure (without derivatization) and for OPA method.

Parameter	Without derivatization		OPA method
	Peak height	Peak area	Peak area
Retention time \pm SD ¹ , min	2.834 \pm 0.003		6.275 \pm 0.013
Linear regression ²	A = 317.89 c + 1.76	A = 978.75 c - 5.87	A = 4320.6 c - 4.94
Standard error of the slope	4.62	10.09	108.20
Standard error of the intercept	2.55	6.55	14.61
R ²	0.9998	0.9998	0.9991
DL ³ , $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.05	0.02	0.07
QL ⁴ , $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.16	0.06	0.23
Within-day precision ⁵ :			
RSD (0.1 mg mL ⁻¹ , n=10), %	0.42	0.60	0.86
RSD (0.9 mg mL ⁻¹ , n=10), %	0.15	0.13	0.51
Between-day precision ⁶ :			
RSD (0.1 mg mL ⁻¹ , n=10), %	0.96	1.02	0.86
RSD (0.9 mg mL ⁻¹ , n=10), %	0.57	0.79	0.51
Recovery (0.1 mg mL ⁻¹) ⁷ , %	100.8	100.4	100.8
Recovery (0.2 mg mL ⁻¹) ⁷ , %	100.5	100.6	100.6

¹– evaluated for 10 non-succeeding injection (realized during one week);

²– A = absorbance value, mAU, c = glucosamine concentration, mg mL⁻¹;

³– detection limit based on S/N 3:1;

⁴– quantification limit based on S/N 10:1;

⁵– 10 succeeding injection of this same solution;

⁶– 10 not-succeeding injections of this same solution (realized during one week);

⁷– evaluated for 3 replicates of standard addition 0.1 mg mL⁻¹ and 0.2 mg mL⁻¹ (see Materials and methods).

Source: Authors own elaboration.

Table 2. Results of recovery experiments obtained for the proposed procedure, mean concentration values determined in sample solution are given with respective standard deviation values (n = 3).

Standard added, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peak height signal mode		Peak area signal mode	
	Mean \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)
0	313.1 \pm 0.9	-	304.8 \pm 2.6	-
100	413.9 \pm 1.1	100.8	405.2 \pm 1.9	100.4
200	514.1 \pm 1.3	100.5	506.0 \pm 2.1	100.6

Source: Authors own elaboration.

It is generally accepted that the conformity between results obtained in the analysis of this same sample by means of different analytical procedures indicate that the “true” concentration value for the target species had been approached. *O*-phthalaldehyde (OPA) has been previously used for the derivatization of glucosamine (on $-NH_2$) prior to reversed phase separation (Dominguez & Dunn, 1987; Eikenes *et al.*, 2005; Nemati *et al.*, 2007) and this procedure has been selected in the present work for comparative purposes. The reaction was carried out in automatic mode, as described in Materials and methods. The separation and detection conditions are also listed in Materials and methods. Since the analysis of pharmaceutical formulations does not require high sensitivity, spectrophotometric detection (340 nm) was used. The calibration range was the same as for the procedure without derivatization, however all solutions were diluted with the mobile phase (1:50) prior to injection. In figure 1b, the chromatograms obtained for the solution of pharmaceutical formulation with and without standard addition are shown. It should be stressed that the chromatographic run time was 10 min, more than two times longer with respect to the procedure without derivatization (4 min). Furthermore, the elution of two anomers of the OPA-glucosamine product can be observed in figure 1b, in agreement with the previous reports (Eikenes *et al.*, 2005). For quantification, the sum of the two peak areas was taken. The analytical parameters evaluated for OPA method are given in table 1. As can be observed, the recovery values were 100.8% and 100.6% for two levels of standard addition (0.1 mg mL^{-1} and 0.2 mg mL^{-1}), confirming the accuracy of this procedure.

Three commercial products were analyzed using the two chromatographic procedures. In each case, five sub-samples were run and the results are shown in table 3. No statistically significant differences were found between results obtained by the procedure without derivatization and those obtained by OPA method (ANOVA), which confirms good accuracy of the determination. On the other hand, for the two pharmaceuticals, the results

obtained were consistent with the values reported by the manufacturer; however, the glucosamine concentration found in product 1 corresponded to about 70 % of the value given on the label. This finding confirms previous study, in which similar discrepancies were observed while analyzing 14 different commercial products available in Canada (Russell, Aghazadeh-Habashi & Jamali, 2002) and also indicates the need for routine analytical control of these products, in consistency with the recent comprehensive review (Aghazadeh-Habashi & Jamali, 2011).

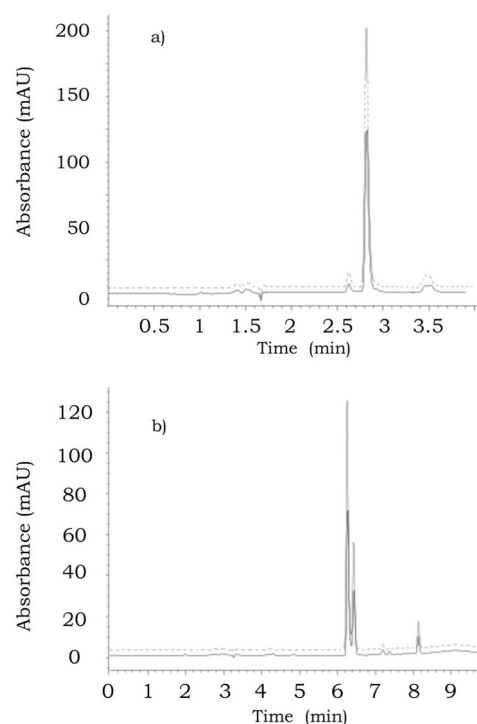


Figure 1. Reversed phase chromatograms obtained for product 2 by the two procedures: a) without derivatization and b) with OPA derivatization. (—) the diluted sample and (---) after standard addition ($8 \mu\text{L } 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ glucosamine, final concentration in the injected solution 0.2 mg mL^{-1}). For better comparison of the graphs, they have been offset on y axis.

Source: Authors own elaboration.

Table 3.

Analytical results obtained for glucosamine in the commercial pharmaceuticals in the application of the proposed procedure (without derivatization) and OPA method.

Pharmaceutical formulation	Mean result \pm SD, mg/tablet ($n = 5$)		Peak area signal mode
	Without derivatization		OPA
	Peak height	Peak area	Peak area
Product 1 (500 mg/tablet)	361.2 ± 0.8	346.1 ± 0.3	363.6 ± 3.7
Product 2 (300 mg/tablet)	313.1 ± 0.9	304.8 ± 2.6	306.5 ± 1.4
Product 3 (500 mg/tablet)	495.0 ± 1.2	477.0 ± 5.6	501.5 ± 1.0

Source: Authors own elaboration.

CONCLUSIONS

In this work, the feasibility of reversed phase chromatographic determination of glucosamine in pharmaceutical products without pre-column derivatization was demonstrated in terms of sensitivity, within-day and between-day precision and also in the recovery experiments. For accuracy checking, three commercial products were analyzed by the procedure proposed and after derivatization of glucosamine with OPA; no statistically significant differences were detected between the results obtained in each procedure, confirming accuracy. The main features that make this procedure attractive for high throughput routine analyses, are the following: (1) no pre-column derivatization; (2) the use of typical reversed phase analytical column; (3) isocratic elution; (4) high peak purity with short retention time; (5) chromatographic run completed in 4 min without necessity of column cleaning and equilibration; (6) good precision and accuracy with extremely simple procedure and low cost.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support from Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt), Mexico (project CB-2012-01-178553) is kindly acknowledged.

REFERENCES

- Aghazadeh-Habashi, A. & Jamali, F. (2011). The glucosamine controversy; a pharmacokinetic issue. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 264-273.
- Ander, B., Karlsson, A. & Ohrlund, A. (2001). Determination of heparin on intracellular lens surfaces by ion chromatography. *Journal of Chromatography*, 917(1-2), 105-110.
- Anumula, K. R. (1994). Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 220(2), 275-283.
- Campo, G. M., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Vinci, R. & Calatroni, A. (2001). Improved high-performance liquid chromatographic method to estimate aminosugars and its application to glycosaminoglycan determination in plasma and serum. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 765(2), 151-160.
- Chaisuwan, P., Kongprasertsak, T., Sangcakul, A., Smith, N. W., Nachapricha, D., Wilairat, P. & Uraisin, K. (2011). Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C4D method. *Journal of Chromatography B*, 879(23), 2185-2188.
- Cheng, X., & Kaplan, L. A. (2003). Simultaneous Analyses of Neutral Carbohydrates and Amino Sugars in Freshwaters with HPLC-PAD. *Journal of Chromatography Science*, 41(8), 434-438.
- Chiusaroli, R., Piepoli, T., Zanelli, T., Ballanti, P., Lanza, M., Rovati, L. C. & Caselli, G. (2011). Experimental pharmacology of glucosamine sulfate. Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Rheumatology*, doi:10.1155/2011/939265
- Cohen, S. A. & De Antonis, K. M. (1994). Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A*, 661(1-2), 25-34.
- Distler, J. & Anguelouch, A. (2006). Evidence-based practice: review of clinical evidence on the efficacy of glucosamine and chondroitin in the treatment of osteoarthritis. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 18(10), 487-493.
- Dominguez, L. M. & Dunn, R. S. (1987). Analysis of OPA-derivatized amino sugars in tobacco by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography Science*, 25(10), 468-471.
- Eikenes, M., Fongen, M., Roed, L. & Stenström, Y. (2005). Determination of chitosan in wood and water samples by acidic hydrolysis and liquid chromatography with online fluorescence derivatization. *Carbohydrate Polymers*, 61(1), 29-38.
- Gaonkar, P., Khanvilkar, V., Shettigar, R. & Gadgoli, C. (2006). Spectrophotometric method for determination of glucosamine in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 68(1), 83-84.
- Liang, Z., Leslie, J., Adebowale, A., Ashraf, M. & Eddington, N. D. (1999). Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with UV HPLC. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20(5), 807-814.
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I. & Delgado-Rosas, K. E. (2007). Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC. *Journal of Chromatography Science*, 45(4), 195-199.
- Nemati, M., Valizadeh, H., Ansarin, M. & Ghaderi, F. (2007). Development of a simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, 90(2), 354-357.
- Palace, G. P. & Phoebe Jr., C. H. (1997). Quantitative determination of amino acid levels in neutral and glucosamine-containing carbohydrate polymers. *Analytical Biochemistry*, 244(2), 393-403.
- Qi, L., Zhang, S. F., Zuo, M. & Chen, Y. (2006). Capillary electrophoretic determination of glucosamine in osteoarthritis tablets via microwave-accelerated dansylation. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1620-1624.
- Ragle, R. L. & Sawitzke, A. D. (2012). Nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a critical review. *Drugs Aging*, 29(9), 717-731. doi: 10.1007/s40266-012-0006-3
- Russell, A. S., Aghazadeh-Habashi, A. & Jamali, F. (2002). Active ingredient consistency of commercially available glucosamine sulfate products. *Journal of Rheumatology*, 29(11), 2407-2409.
- Shao, Y., Alluri, R., Mummert, M., Koetter, U. & Lech, S. (2004). A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(3), 625-631.

- Soga, T. & Heiger, D. N. (1998). Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 261(1), 73-78.
- Solomon, W. D. S., Kumar, R. A., Anand, P. R. V., Sivakumar, R. & Venkatnarayanan, R. (2010). Derivatized HPTLC method for simultaneous estimation of glucosamine and ibuprofen in tablets. *Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 2(2), 156-162.
- Vlad, S. C., LaValley, M. P., McAlindon, T. E. & Felson, D. T. (2007). Glucosamine for pain in osteoarthritis: why do trial results differ? *Arthritis & Rheumatology*, 56(7), 2267-2277.
- Yu, Y., Cai, L., Zuo, M. & Duan, G. (2005). Precolumn derivatization liquid chromatography with mass spectrometry assay for the determination of glucosamine in small volume human plasma. *Annali di Chimica*, 95(9-10), 709-713.
- Zhou, J. Z., Waszkuc, T. & Mohammed, F. (2004). Single laboratory validation of a method for determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization. *Journal of AOAC International*, 87(5), 1083-1092.
- Zhou, J. Z., Waszkuc, T. & Mohammed, F. (2005). Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(4), 1048-1058.
- Zhu, X., Cai, J., Yang, J. & Su, Q. (2005). Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 340(10), 1732-1738.