



Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Posgrado en Química

**“Desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos
para evaluación de la respuesta de plantas a estrés biótico y
abiótico”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctor en Química

PRESENTA

Q.I. Julio César Torres Elguera

Guanajuato, Gto., 26 de Junio del 2014



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN QUÍMICA

Guanajuato, Gto., 1 de Julio de 2014

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “Desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos para evaluación de la respuesta de plantas a estrés biótico y abiótico”. Realizado por el Q.I. Julio César Torres Elguera en el laboratorio 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 Wrobel y el Dr. Kazimierz Wrobel.

“La verdad os hará libres”

Dra. Katarzyna Wrobel

Dr. Kazimierz Wrobel

Miembros del jurado asignados para el examen que para obtener el grado de Doctor en Química presenta el Q.I. Julio César Torres Elguera.

Dra. Leticia López Martínez

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Dra. Vianey Graciela Olmedo Monfil

Dr. Eduardo Peña Cabrera

Dr. David Muñoz Rodríguez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL DEL PROYECTO	4
I.1. PLANTAS	5
I.2. ESTRÉS EN PLANTAS	5
I.3. COMPUESTOS FENÓLICOS	9
I.4. FÓSFORO	10
I.5. FITOHORMONAS	11
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	15
II.1. OBJETIVO GENERAL	16
II.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	16
CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL	17
III.1. EQUIPO DE LABORATORIO	18
III.1.1. <i>Instrumentación analítica</i>	18
III.1.2. <i>Equipos utilizados en procesamiento de muestra y/o preparación de reactivos</i>	18
III.2. REACTIVOS Y ESTÁNDARES.....	19
III.2.1. <i>Reactivos y estándares para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante</i>	19
III.2.2. <i>Reactivos y estándares para la especiación de fosfito y fosfato</i>	19
III.2.3. <i>Reactivos y estándares para la determinación de ácido gibberélico</i>	19
III.2.4. <i>Reactivos y estándares para la determinación de auxinas con BODIPYs</i>	20
III.3. SOFTWARE	20
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
IV.1. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR IONIZACIÓN EN FLAMA.	22
IV.1.1. <i>Introducción</i>	22
IV.1.2. <i>Objetivo</i>	25
IV.1.3. <i>Parte experimental</i>	25
IV.1.4. <i>Resultados y discusión</i>	26
IV.1.5. <i>Conclusiones</i>	31
IV.2. IMPACTO DE LOS IONES CADMIO, SELENITO Y MEZCLA DE LOS DOS EN EL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>LEPIDIUM SATIVUM</i>	32
IV.2.1. <i>Introducción</i>	32
IV.2.2. <i>Objetivo</i>	33
IV.2.3. <i>Parte experimental</i>	34
Muestras biológicas.....	34
Fraccionamiento de compuestos fenólicos y su determinación por GC-FID.....	34
Ensayo espectrofotométrico de la capacidad antioxidante	36
Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos.....	37
Análisis estadístico.....	37
IV.2.4. <i>Resultados y discusión</i>	38

IV.2.5. Conclusiones	57
IV.3. MONITOREO DE IÓN ÓXIDO DE FÓSFORO PARA LA ESPECIACIÓN ANALÍTICA DE FOSFITO Y FOSFATO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS POR HPLC-ICP-MS	59
IV.3.1. Introducción	59
IV.3.2. Objetivo	61
IV.3.3. Parte experimental	61
Muestras biológicas	61
Metodología	61
IV.3.4. Resultados y discusión	62
IV.3.5. CONCLUSIÓN	72
IV.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GIBBERÉLICO EN PRODUCTOS AGROQUÍMICOS POR ESPECTROMETRÍA UV/VIS CON EL USO DE ESTÁNDAR INTERNO	73
IV.4.1. Objetivo	74
IV.4.2. Parte experimental	74
Muestras biológicas	74
Procedimiento espectrofotométrico propuesto en este trabajo	74
Procedimiento de determinación del ácido gibberélico por cromatografía de líquidos	75
Metodología de análisis por cromatografía de gases	75
IV.4.3. Resultados y discusión	76
Desarrollo del método espectrofotométrico	77
Selección del EI	77
Selección del concentración de HCl	80
Selección del solvente	81
Selección del pH del tampón de fosfatos	82
Selección del tiempo de reacción	83
Condiciones de cruce en cero	85
Procedimiento espectrofotométrico propuesto	86
Determinación del ácido gibberélico por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica	87
Determinación de ácido gibberélico por cromatografía de gases con detección por ionización en flama	89
Comparación de los resultados obtenidos por el micro procedimiento espectrofotométrico propuesto, por cromatografía de líquidos y de gases	90
IV.4.4. Conclusión	92
IV.5. MARCAJE FLUORESCENTE DE AUXINAS CON BODIPYS Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	93
IV.5.1. Introducción	93
IV.5.2. Objetivo	94
IV.5.3. Parte experimental	94
IV.5.4. Resultados y discusión	95
8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY	95
2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY	97
8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY	99
IV.5.5. Conclusión	101
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES	102
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema básico del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de plantas[5].	6
Figura 2 Estructura química de algunas fitohormonas	14
Figura 3 Presentación esquemática de las fórmulas de compuestos fenólicos considerados en este trabajo.	24
Figura 4 Cromatograma de la mezcla de estándares de los compuestos fenólicos derivatizados con BSTFA-TMCS (200 mg L ⁻¹ cada uno). Ác. benzoico (1), 4-hidroxibenzaldehído (2), resorcinol (3), ác. salicílico (4), vanillina (5), ác. cinámico (6), ác. 3-hidroxibenzoico (7), ác. 4-hidroxibenzoico (8), syringaldehído (9), ác. 3,4-dimetoxibenzoico (10), ác. 2,3-dihidroxibenzoico (11), ác. 3-(4-hidroxifenil) propiónico (12), ác. vanílico (13), ác. homovanílico (14), ác. 2,5-dihidroxibenzoico (15), ác. trans 2-hidroxicinámico (16), ác. protocatecuico (17), ác. shikímico (18), ác. 3,4-dihidroxifenilacético (19), ác. homogentísico (20), ác. trans 3-hidroxicinámico (21), ác. quínico (22), ác. siringico (23), ác. p-coumarico (24), ác. gálico (25), ác. ferúlico (26), ác. cafeico (27), ác. sinápico (28), ác. clorogénico (29), y ác. o-anísico (IS).	27
Figura 5 Niveles de concentración de algunos ácidos fenólicos, encontrados en extractos de <i>Lepidium sativum</i> : (a) fracción de compuestos solubles y (b) fracción de compuestos insolubles (negro – planta control; blanco – planta expuesta a Cd(II); valores de concentración de ácidos en mg/100g del material liofilizado de planta).	30
Figura 6 Niveles de concentración de algunos ácidos fenólicos, encontrados en extractos de dos variedades de la planta de jitomate (Monika y Yaki): (a) fracción de compuestos solubles y (b) fracción de compuestos insolubles (Monika control , Monika infectada , Yaki control y Yaki infectada).	31
Figura 7 Esquema de fraccionamiento de los compuestos fenólicos en material de planta.	35
Figura 8 Cromatogramas GC-FID obtenidos en el análisis de la fracción de compuestos fenólicos libres (fracción 1) para la planta control (—) y la planta expuesta a 2 mg L ⁻¹ Cd(II) (---). Los compuestos encontrados fueron: (1) – ác. o-anísico (IS); (2) – ác. salicílico; (3) - vanillina; (4) - ác. cinámico; (5) - ác. 3-hidroxibenzoico; (6) - syringaldehído; (7) - ác. 3,4-dimetoxibenzoico; (8) – ác. 3-(4-hidroxifenil) propiónico; (9) – ác. vanílico; (10) – ác. homovanílico; (11) – ác. trans 2-hidroxicinámico; (12) – ác. homogentísico, (13) – ác. trans 3-hidroxicinámico; (14) - ác. p-coumárico, (15) – ác. gálico; (16) . ác. ferúlico.	39
Figura 9 Concentraciones totales de los compuestos fenólicos en cuatro fracciones de <i>L. sativum</i> (µg por g de biomasa liofilizada ± DE (n=3), dependiendo de las condiciones de la exposición a Cd(II) y Se(IV).	40
Figura 10 Esquema de la reacción en el ensayo de la capacidad antioxidante con el ABTS[102].	41
Figura 11 Ejemplos de las funciones de calibración obtenidos en el ensayo ABTS en dos diferentes días.	42

Figura 12 Efecto de la exposición de <i>L. sativum</i> en la capacidad antioxidante del extracto de la planta: (a) exposición a ion Cd(II), (b) exposición a Se(IV), (c) curva de respuesta obtenida considerando todas las condiciones de crecimiento.	43
Figura 13 El modelo PCA obtenido para las variables correspondientes a dos fracciones de compuestos fenólicos en <i>L. sativum</i> : letras en negritas – compuestos libres y letras subrayadas – solubles enlazados a glicósidos: (a) estructura de los datos en las coordenadas de dos primeros componentes principales (scores), (b) distribución de variables en las mismas coordenadas (X-loadings).	45
Figura 14 Cromatogramas HPLC-DAD: (a) mezcla de estándares; (b) fracción 1 de <i>L. sativum</i> control (c) fracción 1 de la planta expuesta a 2 mg L ⁻¹ Cd(II) 1 ác. clorogénico, 2 ác. 4-hidroxicinámico, 3 ác. cafeico, 4 ác. vanílico, 5 ác. p-coumárico, 6 ác. sinápico, 7 ác. ferúlico, 8 ác. <i>trans</i> -2-hidroxicinámico, 9 ác. benzoico, 10 ác. cinámico	49
Figura 15 Cromatogramas HPLC-FLD: (a) mezcla de estándares; (b) fracción 1 de <i>L. sativum</i> control (c) fracción 1 de la planta expuesta a 2 mg L ⁻¹ Cd(II) 1 ác. 2,5-dihidroxibenzoico, 2 ác. 2,3-dihidroxibenzoico, 3 ác. o-anísico (IS), 4 ác. salicílico.....	50
Figura 16 Actividad antioxidante evaluada con base en las contribuciones de los compuestos individuales, en las fracciones 1 (fenólicos libres, —) y 2 (fenólicos solubles unidos a glicósidos, ····) de <i>L. sativum</i> , cultivados en presencia de: (a) Cd(II) y (b) Se(IV). A manera de suma global se presenta el efecto de ambas fracciones (----).....	52
Figura 17 Perfiles de actividad antioxidante para trece cultivos de <i>L. sativum</i> expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II), Se(IV) o ambos iones, evaluados para (a) - fenólicos libres (fracción 1), (b) - fenólicos solubles unidos a glicósidos (fracción 2) y (c) – fenólicos solubles totales (fracción 1 + 2).	53
Figura 18 El modelo PCA obtenido con base en las concentraciones de los ácidos clorogénico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, vanílico, p-coumárico, sinápico, ferúlico, <i>trans</i> 2-hidroxicinámico, 2,5-dihidroxibenzoico y 2,3-dihidroxibenzoico, determinados en las fracciones 1 y 2 de <i>L. sativum</i> : crecido en diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV): letras en negritas – fracción 1 de compuestos libres y letras subrayadas – fracción 2 de fenólicos solubles enlazados a glicósidos: (a) estructura de los datos en las coordenadas de dos primeros componentes principales (scores plot), (b) distribución de variables en las mismas coordenadas (X-loadings plot).	56
Figura 19 Efecto del ácido nítrico en la señal <i>m/z</i> 47 por ICP-MS: (-♦-) agua desionizada; (-●-) ftalato de potasio 5 mmol L ⁻¹ ; (-■-) 25 µgP L ⁻¹ de P(V) en ftalato de potasio 10 mmol L ⁻¹ ; (-▲-) señal de fósforo menos la de ftalato.....	64
Figura 20 Efecto de la velocidad del flujo de He en la celda del octopolo en la señal <i>m/z</i> 47 por ICP-MS: (-■-) BEC, µgP L ⁻¹ ; (-♦-) 25 µgP L ⁻¹ de fosfato en la fase móvil; (-●-) ftalato de potasio en 8 mmol L ⁻¹ de ácido nítrico.	65
Figura 21 Superficie de respuesta para la señal neta de 10 µgP L ⁻¹ como P(V) obtenido en con un voltaje en la entrada de celda de -36 V, y diferentes voltajes en los lentes de extracción 1 (180V - -50V) y extracción 2 (-130V - -60V).	66
Figura 22 Cromatogramas obtenidos por HPLC – ICP-MS: (—) mezcla de estándares de fosfato + fosfito, 250 µgP L ⁻¹ de cada uno; (-♦-) mezcla de estándares de fosfato + fosfito	

standard mix, 1000 $\mu\text{g P L}^{-1}$ de cada uno; (.....)extracto de planta; (----)extracto de planta con adición de estándar de P(III) + P(V), 250 $\mu\text{g P L}^{-1}$ de cada uno: (a) m/z 47, (b) m/z 31.	71
Figura 23 Estructura química del ent-gibberelano	73
Figura 24 Esquema general de trabajo.	76
Figura 25 Estructura de algunos compuestos examinados como posibles EI en este trabajo. A-Azul de metileno; B-Rojo congo; C-Verde brillante, D- 4-Nitrofenol; E- 3- Nitrofenol; F-Azul nilo; G – Mordiente azul I.....	78
Figura 26 Espectro de absorción correspondiente a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 3-nitrofenol(---), 100 $\mu\text{g/mL}$ de GA3 (••) y mezcla de GA3 con 3-nitrofenol (—).....	79
Figura 27 Espectro de absorción correspondiente a 100 mg L^{-1} de 4-nitrofenol (---), 100 mg L^{-1} de GA3 (••) y mezcla de GA3 con 4-nitrofenol (—).....	79
Figura 28 Espectro de absorción correspondiente a 65 mg L^{-1} de mordiente azul I (---), 100 mg L^{-1} de GA3 (••) y mezcla de GA3 con mordiente azul I (—).	80
Figura 29 Señales de absorción del mordiente azul 65 mg L^{-1} en 465 nm (—) y ácido giberelénico 200 mg L^{-1} en 254 nm (---) en función del volumen de HCl 6N.....	81
Figura 30 Espectros de absorción de mezclas analito (200 mg L^{-1}) y del EI (65 mg L^{-1}) obtenidos empleando en la extracción los siguientes solventes orgánicos: Metiletilcetona(— —), Metilisobutilcetona(— · —), Acetato de etilo(- - -), Cloroformo(· · ·) y Diclorometano(—).....	82
Figura 31 Efecto del pH del tampón de fosfatos en las señales de absorción del mordiente azul 65 mg L^{-1} (—) (465 nm), ácido giberelénico 200 mg L^{-1} (---) y 500 mg L^{-1} (••) (254 nm)..	83
Figura 32 Cromatograma de la solución estándar de 20 mg L^{-1} después de 20 minutos de reacción, la señal A corresponde al ácido giberelénico y la B al GA3.....	84
Figura 33 Seguimiento de la conversión de 100 mg L^{-1} de ácido gibberélico(···) en ácido giberelénico(—), se presentan las áreas de los picos cromatográficos correspondientes (HPLC). Para el EI (65 mg L^{-1}) se midió la absorbancia en la mezcla de reacción en 465 nm.	84
Figura 34 Primera derivada de espectros de las soluciones de calibración del ácido giberelénico observando el espectro completo de lectura(A) y acercamiento a las soluciones de calibración de ácido giberelénico 0, 20, 60, y 100 mg L^{-1} (B) y del EI mordiente azul I 65 mg L^{-1} (C).....	85
Figura 35 Cromatograma de la solución estándar de 0.1 mg mL^{-1} (••) y la muestra Biogib (—)	88
Figura 36 Cromatograma de la solución estándar de 0.5 mg mL^{-1} (••) y la muestra Biogib (—)	89
Figura 37 Estructura base de los borodipirrometenos (BODIPY).....	93
Figura 38 Reacción de esterificación entre el 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY y el ácido indolacético.....	95
Figura 39 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY...	95

Figura 40 Espectro de masas del 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY utilizando la ionización por electronebulización en modo negativo. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.	96
Figura 41 Cromatograma que presenta la reacción de A)Ácido indolacético, B)Ácido indolbutírico, C)Ácido naftalenacético a una concentración de 20mg L ⁻¹ con el 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY, en donde el eje X representa el tiempo y el eje Y muestra la normalización entre las señales de los detectores de arreglo de diodos a 495nm(---) y el fluorimétrico con Ex 495 y Em 520nm(—).	97
Figura 42 Fotografías bajo luz visible del A)8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY y del B)ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con λ 365 nm C) y D) respectivamente.	97
Figura 43 Estructura del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY	98
Figura 44 Espectro de masas del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY obtenido en ESI con lapolarización negativa. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.	98
Figura 45 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY	98
Figura 46 Fotografías bajo luz visible del A) del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY y del B)ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con λ 365 nm C) y D) respectivamente.	99
Figura 47 Estructura del 8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY	99
Figura 48 Espectro de masas del 8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY obtenido en la modalidad de lectura de aniones. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.	100
Figura 49 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del del 8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY ..	100
Figura 50 Fotografías bajo luz visible del A) del 8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY y del B)ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con λ 365 nm C) y D) respectivamente.	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Algunos ejemplos de metodologías analíticas empleadas para el análisis de compuestos fenólicos en material de plantas.....	23
Tabla 2 Las condiciones instrumentales seleccionadas para el análisis de los compuestos fenólicos por GC-FID.....	26
Tabla 3 Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos.....	29
Tabla 4 Capacidad antioxidante evaluada en los extractos de <i>L. sativum</i> en diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV).	42
Tabla 5 Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos individuales (ensayo ABTS, detalles en la parte experimental).	51
Tabla 6 Condiciones de operación de ICP-MS.	63
Tabla 7 Parámetros analíticos evaluados para la separación por intercambio anionico de fosfato y fosfito con detección de ³¹ P y ⁴⁷ PO por ICP-MS (valores medios, desviación estándar y CV obtenidos de cinco réplicas).....	69
Tabla 8 Resultados de la cuantificación obtenidos en el análisis de muestras de plantas por los procedimientos propuestos con detección en <i>m/z</i> 31 y <i>m/z</i> 47 por ICP-MS. Valores de concentración medios con su respectiva DE son presentados basados en el análisis por triplicado de cada biomasa.	72
Tabla 9 Condiciones de análisis de GA3 en cromatografía de líquidos.....	75
Tabla 10 Condiciones de análisis para el GA3 por cromatografía de gases.....	76
Tabla 11 Parámetros analíticos del procedimiento espectrofotométrico propuesto, evaluados con base en diferentes señales analíticas.....	86
Tabla 12 Resultados de determinación de GA3 en productos comerciales obtenidos utilizando micro procedimiento espectrofotométrico propuesto (para fines comparativos se incluyen los valores reportados por el fabricante.....	87
Tabla 13 Principales parámetros analíticos evaluados en la determinación del GA3 por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica.	88
Tabla 14 Resultados de cuantificación del GA3 en productos agroquímicos, obtenidos por el método y los contenidos reportados por el fabricante (nd - no detectado).....	89
Tabla 15 Parámetros analíticos evaluados para la determinación del GA3 por GC-FID.....	90
Tabla 16 Cuantificación del GA3 en productos agroquímicos por GC-FID y los valores reportados por el proveedor. (n.d. No detectable).....	90
Tabla 17 Parámetros analíticos evaluados en los tres procedimientos.....	91
Tabla 18 Resultados del análisis de GA3 en los productos agroquímicos obtenidos utilizando diferentes procedimientos analíticos.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOx	Capacidad antioxidante
BEC	Concentración equivalente de la señal de fondo
BSTFA-TMCS	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano
cps	Cuentas por segundo
DAD	Detector de arreglo de diodos
EI	Estándar interno
d.i.	Diámetro interno
FLD	Detector fluorimétrico
GA3	Ácido gibberélico
GC-FID	Cromatógrafo de gases con detector de ionización en flama
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-DAD	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica
HPLC-DAD-FLD	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica y espectrofluorimétrica
HPLC-ICP-MS	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección espectrométrica de masas con plasma acoplado inductivamente.
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
min	Minutos
<i>m/z</i>	Relación masa (atómica o molecular) y su carga
P(III)	Fosfito
P(V)	Fosfato
PCA	Análisis de componentes principales
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SPE	Extracción en fase sólida
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible

RESUMEN

El desarrollo de procedimientos analíticos adecuados para la evaluación de diferencias en el crecimiento y metabolismo de las plantas, en donde las variables dependientes sean las condiciones a las que pueden encontrarse sometidas, resultan en un reto importante para la química analítica moderna. El criterio primordial en esta tarea es que el procedimiento asegure la calidad de los resultados analíticos de acuerdo con las necesidades en términos de selectividad, sensibilidad, precisión y exactitud. Por otra parte, existe una clara tendencia hacia el uso de procedimientos “fáciles”, es decir con el protocolo no riguroso, de ser posible con el mínimo número de operaciones, la aplicación de etapas que permitan llevarse a cabo a escala micro, que cumplan con los lemas de química verde y que por todas estas características, pueden ser utilizadas en el análisis de largas series de muestras. La caracterización cualitativa y cuantitativa de compuestos que se generan o los compuestos que se transforman debido a distintas situaciones de estrés, ya sea biótico o abiótico, es de vital importancia para entender los mecanismos responsables de respuesta hacia estas condiciones de crecimiento poco favorables. En este sentido, el proyecto de tesis ha sido centrado en el desarrollo de diversos procedimientos analíticos para ofrecer apoyo a los laboratorios equipados con la instrumentación simple y austera y por otro lado, para incidir en el avance metodológico utilizando la tecnología de punta a nivel mundial. Entre las posibles aplicaciones, se pueden mencionar estudios de la contaminación ambiental, seguridad alimenticia, agricultura, desarrollo de plantas modificadas genéticamente, entre otros.

El Capítulo I es la introducción general, donde se explica el concepto de metabolismo primario y secundario de las plantas, se presenta la descripción del estrés en las mismas, sus posibles causas y manifestaciones y, finalmente se describen de manera general los compuestos sobre los cuales se trabajó en esta tesis. El objetivo general y los objetivos específicos se plantean en el Capítulo II y en el Capítulo III se presenta brevemente la lista de equipos instrumentales, reactivos, materiales de laboratorio, muestras y paquetes de software utilizados en el desarrollo experimental. El Capítulo IV, donde se describen y discuten los resultados obtenidos, está dividido en cinco partes, cada una de ellas atiende uno de los objetivos particulares definidos en el Capítulo II. De esta manera, en el Capítulo IV.1. se propone un método de separación y cuantificación de un total de 29 compuestos fenólicos mediante GC-FID. Posteriormente en el

Capítulo IV.2. a partir de diferentes cultivos hidropónicos correspondientes a diferentes condiciones de exposición a iones Cd(II), Se(IV) y Cd(II) + Se(IV) como agentes del estrés abiótico. Se realizó la extracción de compuestos fenólicos de la biomasa para su análisis por GC-FID, se evaluó el poder antioxidante del extracto utilizando el ensayo espectrofotométrico. Para complementar el estudio, se seleccionaron 13 compuestos, mismos que fueron determinados en los extractos por cromatografía de líquidos, se evaluó la capacidad antioxidante individual de cada uno de ellos y los resultados obtenidos fueron comparados estadísticamente con aquellos obtenidos por el ensayo espectrofotométrico directamente en los extractos de la planta. Estos datos permitieron formular una serie de conclusiones que contribuyen en el mejor entendimiento de los efectos de cadmio y selenio así como el proporcionar nuevas evidencias del efecto protector del selenio en *L. sativum*. En el Capítulo IV.3. se describe el desarrollo de un nuevo procedimiento de especiación analítica de fosfito y fosfato en plantas transgénicas, basado en el acoplamiento de cromatografía de líquidos por intercambio aniónico con detección ICP-MS. La adición de ácido nítrico a la fase móvil fue propuesta para mejorar la formación del ión óxido de fósforo para su detección a m/z 47, así evitando las interferencias poliatómicas que se presentan en m/z 31 y eliminando la introducción de oxígeno para la detección de PO^+ . El procedimiento de limpieza de la muestra, separación cromatográfica y las condiciones de operación fueron seleccionadas experimentalmente, finalmente los parámetros analíticos obtenidos para la detección de los iones de óxido de fósforo (PO^+ , m/z 47) se compararon contra los correspondientes a fósforo elemental (P^+ , m/z 31). Los Capítulos IV.4. y IV.5. están dedicados al análisis de hormonas de plantas; en la primera sección se desarrolla un procedimiento que permite la cuantificación de la fitohormona ácido gibberélico en productos industriales mediante espectrofotometría UV/Vis, para su uso en los laboratorios de control de calidad. La dificultad particular fue que el ácido gibberélico presenta baja absorptividad en la región ultravioleta, no presenta fluorescencia y no posee características químicas que permitan un ensayo específico. En esta situación, se ha propuesto la conversión química del compuesto a una especie absorbente y, además, el uso de estándar interno para controlar posibles errores aleatorios durante el manejo de muestra. Asimismo, se ha explorado derivatización del analito formando especie volátil para su determinación por GC-FID. De manera complementaria, se utilizó cromatografía de líquidos en fase inversa, como una técnica de referencia. La segunda sección (Capítulo IV.5), se enfoca en el análisis fitohormonas, específicamente del grupo de las auxinas, después de su acoplamiento con derivados de borodipirrometenos (BODIPY), con la finalidad de formar especies fluorescentes

que permitan cuantificar estas auxinas que generalmente se encuentran a concentraciones muy bajas en las plantas.

La finalización del proyecto permitió formular una serie de conclusiones que se presentan en el capítulo V. El Capítulo VI y último, corresponde a las referencias citadas en la tesis. En el Anexo se presentan copias de los dos artículos publicados con base en los resultados de trabajo de investigación en revistas indexadas, incluidas en Thompson Reuter Journal Citation Reports.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL DEL PROYECTO

I.1. PLANTAS

Las plantas son seres vivos fotosintéticos, no poseen la capacidad locomotora para trasladarse y su desarrollo se basa en la captación de materia prima que se encuentre a su alrededor como luz, dióxido de carbono, agua y elementos minerales, con estos componentes es capaz de convertir materiales sencillos en compuestos orgánicos complejos que apoyarán a la adaptación de su ambiente [1]. Durante su ciclo de vida, la planta crea una variedad de células, tejidos y órganos y de esta manera adquiere su forma, aumenta su masa y volumen [2]. Esto se lleva a cabo mediante la maquinaria del metabolismo donde se pueden distinguir dos tipos de los productos: (1) los metabolitos primarios que son compuestos comunes a todas las células y necesarios para el funcionamiento del organismo (principalmente aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos) [3] y (2) los metabolitos secundarios que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de los metabolitos primarios. En plantas, los metabolitos secundarios están presentes en pequeñas cantidades, su distribución entre tejidos no es uniforme y su variedad depende del tipo de planta. El metabolismo secundario es importante en las propiedades sensoriales de la planta así como en su respuesta defensiva en condiciones de estrés [4]. La relación entre el metabolismo primario y secundario se presenta esquemáticamente en la Figura 1[5]. En cuanto a la clasificación de los productos secundarios, éstos se agrupan en cuatro clases: (1) terpenos los que incluyen hormonas, pigmentos o aceites esenciales; (2) compuestos fenólicos entre los cuales se encuentran cumarinas, flavonoides, ligninos y taninos; (3) glicósidos los que son saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos y (4) alcaloides.

I.2. ESTRÉS EN PLANTAS

El estado de estrés se define como la reacción del organismo a los factores externos que amenazan su funcionamiento normal. En plantas, el estrés biótico es provocado por seres vivos, mientras que el estrés abiótico es producido por agentes tales como plaguicidas, metales pesados, cambios en la salinidad, altas y bajas temperaturas, alta intensidad de luz o sequía. Las plantas responden ante el estrés mediante diversos mecanismos de defensa y/o tolerancia.

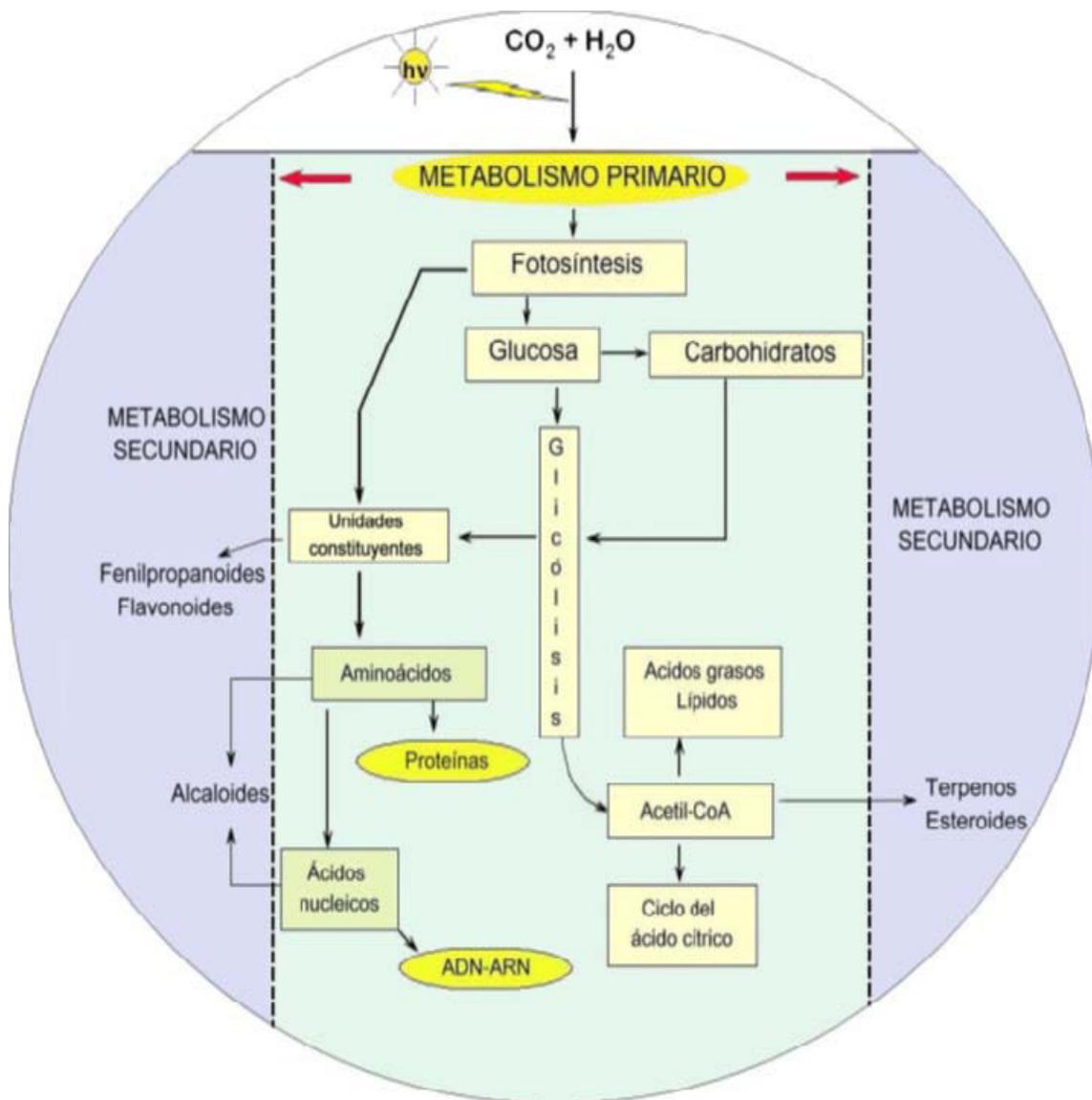


Figura 1 Esquema básico del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario de plantas [5].

El primer aspecto a considerar se relaciona con el acceso de xenobióticos, u organismos patógenos a las plantas. La defensa de las plantas contra la invasión por bacterias u hongos patógenos depende de los mecanismos de colonización [6] y este tema no forma parte del proyecto. En el caso de los metales pesados, la defensa de la planta puede llevarse a cabo en el espacio exterior, mediante las asociaciones simbióticas con hongos microscópicos y bacterias, además de los exudados de la pared y la membrana celular [7]. 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, o la inmovilización dentro

de las vacuolas. Adicionalmente, se puede dar la sorción de los compuestos en la envoltura de las hifas, cuya hidrofobia ayuda a reducir la movilidad de los metales [8, 9]. La presencia de rizobacterias que juegan un papel importante en la captación y reciclaje de nutrientes, mantenimiento de las características del suelo y control de plagas que atacan a la planta, puede disminuir o aumentar la captación de elementos tóxicos [10]. La actividad metabólica de algunos microorganismos puede también afectar la especiación actual del elemento en el suelo, cambiando su potencial biodisponibilidad y toxicidad. Tal es el caso de la reducción de Cr(VI) a Cr(III), un ejemplo de ello es la bacteria *Xanthomonas maltophyla* que es capaz de llevar a cabo la reducción a Cr(III), en donde este último es mucho menos biodisponible respecto a la forma hexavalente [11]. En cuanto a los mecanismos que emplea la misma planta para evitar la captación de metales pesados, ya fue mencionado el papel de las paredes celulares, formadas en su mayoría por fibras de celulosa y ligninos. Algunos autores reportaron la acumulación de elementos metálicos tóxicos en esta parte de la planta mediante su asociación con diferentes grupos funcionales y tipos de compuestos (compuestos fenólicos, glicoproteínas, etc.) [12]. Por otra parte, las paredes celulares en las raíces permiten la exudación de compuestos sintetizados por la planta tales como ácidos orgánicos, algunos aminoácidos y péptidos, capaces de acomplejar los iones metálicos al exterior de la planta y así regular su biodisponibilidad [13]. Otra barrera para las especies metálicas son las membranas plasmáticas, las cuales pueden reducir la captación o bien expulsar especies metálicas de manera activa. Finalmente, dentro del protoplasto existe una gran variedad de mecanismos posibles incluyendo la síntesis de ácidos orgánicos, aminoácidos y péptidos, capaces de acomplejar los iones metálicos. Es importante que, una vez “neutralizadas”, las especies metálicas pueden ser transportadas dentro de la vacuola, lo que permite aislarlas del resto de organelos y de esta manera evitar sus efectos tóxicos.

El segundo aspecto a considerar es la respuesta de la planta a los xenobióticos u organismos patógenos que lograron penetrar a su interior y no han sido neutralizados/eliminados por los mecanismos que se acaban de mencionar. Al presentarse un factor de estrés, dentro de las células vegetales se produce un aumento de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) [14, 15]. Los organismos patógenos afectan la actividad de las enzimas que producen ROS (NADPH oxidasa, diferentes tipos de peroxidadas, etc.), lo que causa principalmente el incremento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno y superóxido. Por su parte, los factores abióticos afectan las funciones de respiración (reacciones de transferencia de un electrón) y de fotosíntesis, lo que también conduce al aumento de las ROS

[14]. Se conoce que las ROS formadas y, en particular el peróxido de hidrógeno, actúan en las rutas de transducción de señales, induciendo los mecanismos de resistencia y defensa génica en plantas [16-18]. Entre los múltiples efectos del peróxido de hidrógeno, hay que mencionar su acción microbicida directamente en los sitios donde se presenta la invasión por el patógeno. Por otra parte, el H₂O₂ es utilizado para fortalecer las paredes celulares, mediante la inducción de los procesos de lignificación, entrecruzamiento oxidativo de proteínas ricas en hidroxiprolina y de otros polímeros presentes en esta parte de planta [19]. También se ha propuesto su papel causativo en apoptosis como el mecanismo que impide la propagación de la infección (colonización por patógeno). Finalmente, el peróxido de hidrógeno participa en la ruta de señalización en respuesta a condiciones de estrés abiótico, lo que permite a la planta acondicionarse a nuevas condiciones [16].

El aumento de las ROS provoca la oxidación de lípidos [20]. Es relevante mencionar que los cambios en las estructuras lipídicas de las membranas celulares pueden afectar (estimular o, al contrario bloquear) los canales iónicos y el transporte de moléculas. En particular, se ha reportado que el incremento de la insaturación de los ácidos grasos en las membranas se relaciona con la tolerancia de las plantas a los metales pesados [21, 22]. Por otra parte, la oxidación de los ácidos grasos inicia la formación de oxilipinas, un grupo de compuestos derivados de los lípidos que están involucrados en los procesos de señalamiento celular en respuesta al estrés [23].

Otro tipo de efectos relacionados con el aumento de las ROS en condiciones de estrés, es la activación de los sistemas anti-oxidantes, incluyendo las rutas enzimáticas y no-enzimáticas [24, 25]. En este contexto, hay que mencionar la síntesis de compuestos fenólicos de la ruta de fenilpropanoides (compuestos derivados del ácido *trans*-cinámico, el cual se forma de L-fenilalanina mediante acción de enzimas de tipo liasa) y flavonoides [26]. Los compuestos comúnmente determinados en las condiciones de estrés han sido: ácido cinámico, ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido cumárico, ácido 2,3-dihidroxibenzóico, ácido 2,5- dihidroxibenzóico, vainilina, ácido ferúlico, entre otros [15, 20, 22, 27-31]. Parece interesante que, ambos tipos de estrés aparentemente inducen la síntesis y acumulación de los mismos metabolitos secundarios [23].

Finalmente, los factores abióticos, sus especies presentes dentro de las células vegetales, las ROS, los productos de peroxidación lipídica y los metabolitos secundarios inducidos en las condiciones del estrés han sido implicados, como factores epigénéticos en la regulación de expresión de genes [22, 32].

Uno de los intereses actuales es conocer al detalle los mecanismos de respuesta de plantas bajo condiciones de estrés, con el fin de aportar y generar conocimientos que puedan impactar en la producción de líneas mejoradas para ser utilizadas tanto en fito-remediación como en producción agrícola.

I.3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son constituyentes importantes de las plantas ya que son necesarios para síntesis de lignina y pigmentos, proveen integridad estructural andamios de soporte para las plantas [33, 34]. En plantas superiores, estos compuestos son considerados metabolitos secundarios que, junto a otros, están implicados en el sistema defensivo de la planta, mediante su participación en la señalización en la defensa de plantas contra el estrés de tipo biótico o abiótico [35, 36]. Además, las estructuras fenólicas en las paredes celulares actúan como barrera física que les infiere la protección contra la incursión de patógenos [37-39].

La importancia de los compuestos fenólicos radica en que son antioxidantes promotores de salud, antimicrobianos y antitumorales, estas son algunas de las propiedades de los compuestos fenólicos presentes en plantas comestibles que promueven su valor nutricional [40, 41], pero además, estas propiedades le proporcionan un valor agregado ya que estos compuestos pueden ser aplicados en distintas áreas como la agricultura, farmacéutica, nutracéutica, cosmética, entre otras [42-44]. Ha sido reportado que bajo condiciones de estrés hay un incremento en la producción de estos compuestos y que un manejo apropiado de las condiciones de exposición pueden estimular el metabolismo de los compuestos fenólicos [45, 46].

Por otro lado, el impacto que sufre la planta por la exposición a metales pesados tales como Cd, Cu, Ni, Zn sobre el perfil de compuestos fenólicos es relacionado con la capacidad antioxidante y ha sido ampliamente estudiado [47-50]. La respuesta de la planta varía dependiendo de la clase de elemento al que se está exponiendo [48, 51-53] así como también varía la tendencia a ser potencializado en la presencia de mezclas de metales pesados [54, 55]. La regulación del metabolismo de compuestos fenólicos ha sido ampliamente estudiada, donde los resultados obtenidos de estas investigaciones indican que la generación de las ROS causada por la presencia de metales pesados afecta la ruta de lignificación en los diferentes niveles [56-58].

Es por ello que resulta de interés el poder obtener información en términos de acumulación y perfil de compuestos fenólicos en respuesta a diferentes tipos de estrés impuestos sobre las plantas. De tal manera que primeramente se trabajó en el desarrollo de una metodología

de cromatografía de gases con detección por ionización en flama que permitiese el análisis de compuestos fenólicos en plantas, en particular para aquellas crecidas bajo diferentes condiciones de estrés ya sea biótico o abiótico, con la finalidad de demostrar que es posible observar diferencias respecto a condiciones ausentes de estrés; en la segunda sección de este trabajo se enfocó a la aplicación de esta metodología durante la exposición de *Lepidium sativum* a iones cadmio y selenio, con la finalidad de demostrar la utilidad del método y presentar evidencias del efecto de estos elementos sobre los compuestos fenólicos.

I.4. FÓSFORO

El fósforo es un nutriente primario en plantas, imprescindible para funciones como fotosíntesis, respiración, construcción de membrana, entre otros. Este elemento constituye entre 0.1 y 0.5% de biomasa y es absorbido por la planta principalmente como iones ortofosfato monobásico o dibásico (P(V)). Debido a que el fósforo en suelos se encuentra en forma de ortofosfatos poco solubles o como constituyente de diversas moléculas orgánicas, su biodisponibilidad es baja y las plantas requieren de suplementación mediante uso de fertilizantes con base en ortofosfato [59]. Esta estrategia resulta en la creciente contaminación medioambiental y eutrofización de ecosistemas, sobre todo acuáticos. Por otro lado, el fósforo en forma de fosfitos (P(III)) presenta mayor solubilidad y biodisponibilidad respecto P(V), pero no puede ser utilizado por plantas para satisfacer sus necesidades, ya que éstas no pueden llevar a cabo la oxidación de P(III) a P(V).

Los fertilizantes basados en fosfato han sido utilizados desde hace mucho tiempo en la agricultura a pesar de que estos productos presentan muchos inconvenientes. En particular, el fosfato tiende a formar compuestos insolubles en el suelo y es fácilmente convertido a distintas formas orgánicas por microorganismos, por lo cual sólo una pequeña parte del fósforo contenido en los fertilizantes puede ser captado y usado de manera efectiva por las plantas. El empleo excesivo de P(V) seriamente contribuye al proceso de eutrofización y resulta en el agotamiento de la roca fosfórica que resulta ser un recurso no renovable [60]. Otra forma de fósforo en las aplicaciones agrícolas es el P(III), comúnmente utilizado como fungicida y algunas veces considerado como bio-estimulador o fuente alternativa de fósforo para el crecimiento de las plantas [61, 62]. Teniendo mejor movilidad el P(III) y una captación similar comparando con el

P(V), es posible aplicar una menor cantidad de fertilizante; sin embargo, para el fosfito se han reportado efectos adversos sobre las mismas [63].

Es por ello que, se están llevando a cabo estudios enfocados en el desarrollo de plantas transgénicas capaces de captar y asimilar el fósforo a partir de la metabolización del P(III) [64]; esta estrategia representa importante ventaja en comparación con fertilización con P(V), ya que permite disminuir la cantidad del fósforo vertido al medio ambiente [65]. Para demostrar la capacidad de las plantas modificadas genéticamente en la oxidación de P(III) a P(V), es necesario contar con datos cuantitativos de estas dos formas de fósforo en los tejidos biológicos de dichas plantas, lo que representa un reto debido a la compleja matriz química de las muestras; estos datos además son necesarios para tener un control y así afinar el desarrollo de estas nuevas plantas. Es importante remarcar que hasta este punto la mayoría de los estudios relacionados al estudio de la relación entre P(III) y P(V) en cultivos fue evaluando únicamente el fósforo total, y el análisis de especiación en plantas de estos dos oxianiones de fósforo raramente se ha llevado a cabo [62, 66-70].

Por lo que en esta sección se desarrolló un procedimiento novedoso para el análisis de estos oxianiones de fósforo. El reto era lograr un procedimiento que fuese sencillo en la extracción de estos compuestos, posteriormente en el ajuste de las condiciones de separación cromatográfica, así como el establecimiento de los mejores parámetros en el ICP-MS que permitiesen una buena detección de estas especies de fósforo, y finalmente su aplicación en plantas transgénicas capaces de metabolizar P(III).

I.5. FITOHORMONAS

Las plantas cuentan con una amplia gama de mecanismos de defensa contra el estrés medioambiental; uno de los elementos de este sistema complejo es mediante la inducción de las moléculas señalizadoras tales como los ácidos jasmónico o abscísico [71]. De manera general, estos compuestos se denominan fitohormonas, debido a su función de mensajeros químicos en regulación de diferentes tipos de procesos vitales en plantas. Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, intervienen en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas, entre otros. Estos reguladores están directamente involucrados en procesos metabólicos o en el

desarrollo, tal es el caso de la producción de amilasa y la inducción de la floración entre otros, al actuar modifican dichos procesos, donde sus efectos varían según su interacción con otros reguladores de crecimiento vegetal, de esta forma regulan o influyen en un rango de procesos celulares y fisiológicos entre los que se cuentan la división celular, diferenciación celular, desarrollo de frutos, tropismos, dormancia de semillas, germinación de semillas, senescencia, abscisión de las hojas, entre otros. Las fitohormonas son usadas ampliamente como productos comerciales en la agricultura, horticultura y biotecnología para modificar y/o controlar el desarrollo así como el crecimiento de las plantas.

Existen siete clases de reguladores de crecimiento vegetal entre los cuales se encuentran auxinas, gibberelinas, citocininas, brasinosteroides, ácido abscísico, estrigolactonas, etileno y ácido jasmónico (Figura 2), las cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. La actividad de estos reguladores sigue una dinámica de regulación intrínseca y un movimiento dentro de la planta, establecido en base a estudios clásicos desde el sitio de producción y transporte de cada regulador; algunos de estos reguladores son adquiridos del suelo afectando el desarrollo de la planta. Dentro de los reguladores que promueven una respuesta fisiológica, existen cuatro grupos principales de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades de regulación del crecimiento en plantas. Se incluyen auxinas, gibberelinas, citoquininas y etileno, mientras que entre los que inhiben el crecimiento o lo retardan se encuentran el ácido abscísico, entre sus funciones principales de algunas de estas hormonas son:

- Ácido Abscísico. Propicia la caída de las hojas, detiene el crecimiento del tallo e inhibe la germinación de la semilla.

- Citocininas. Incrementa el ritmo de crecimiento celular y transforma unas células vegetales en otras.

- Auxinas: Son fitohormonas que regulan el crecimiento de las plantas y además participan como mediadores para la adaptación ambiental [72]. Como respuesta defensiva, las auxinas son capaces de modificar la arquitectura de las raíces, para soportar los efectos debidos a estrés biótico o abiótico [73, 74]. Estas fitohormonas han sido ampliamente estudiadas principalmente por su participación en el desarrollo y crecimiento de las plantas; entre sus funciones se encuentra el control de ciertas partes del ciclo celular como el alargamiento celular, embriogénesis y forma de la estructura de los tejidos [75]. En cuanto a su estructura química, todas son ácidos, contienen grupos fenol o indol siendo las principales auxinas el ácido

indolacético y sus derivados y derivados de naftaleno. La determinación de estas fitohormonas es un reto debido a sus bajas concentraciones en plantas y la matriz de muestra químicamente compleja.

•Gibberelinas. Pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción del desarrollo de flores y frutos [76]. En la naturaleza dichos reguladores de crecimiento vegetal no sólo son producidos por las plantas, sino también otros organismos, presentes en el suelo, los cuales son capaces de sintetizar estos metabolitos y que están en contacto constante con las raíces de las plantas, lo que genera un mejor desarrollo de éstas y así una relación entre la planta y el microorganismo. Estos microorganismos, ya sean hongos o bacterias, son conocidos como promotores de crecimiento vegetal y no sólo son capaces de sintetizar reguladores de crecimiento vegetal, sino que también ayudan a las plantas en otros procesos, evidenciando su producción por medio de bioensayos, por su especificidad y precisión [77-82].

El apartado de la tesis dedicado al análisis de fitohormonas se divide en dos secciones; la primera de ellas se enfoca en la mejora de una metodología para el análisis de ácido gibberélico en productos agroquímicos, mediante la adición de un estándar interno y la aplicación de derivadas en los espectros de UV-Vis, en donde los resultados obtenidos fueron comparados con técnicas cromatográficas. La segunda sección se basa en la evaluación del empleo de tres derivados de borondipirrometenos como marcadores fluorescentes de auxinas, teniendo como finalidad proponer un nuevo esquema adecuado para cuantificar ultratrazas de fitohormonas, en niveles típicamente existentes en plantas.

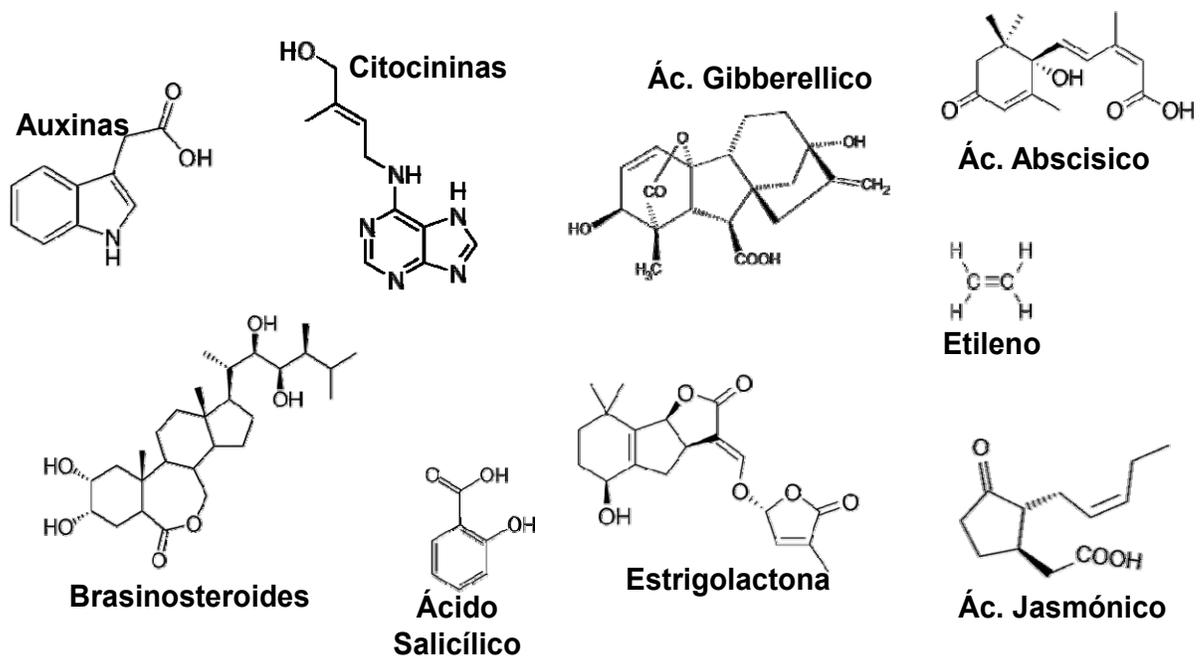


Figura 2 Estructura química de algunas fitohormonas

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico mediante el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos que permitan caracterizar cualitativa- y cuantitativamente los compuestos tales como diferentes formas de agentes químicos que provocan estrés abiótico, productos de actividad metabólica de patógenos y los metabolitos secundarios sintetizados por organismos vegetales en respuesta al estrés.

II.1.1. Objetivos específicos

- Desarrollar un nuevo procedimiento analítico que permita determinar 29 compuestos fenólicos potencialmente presentes en plantas mediante cromatografía de gases con detección por ionización en flama, teniendo como criterio un corto tiempo de análisis y buena sensibilidad.
- Avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de la planta *Lepidium sativum* al estrés abiótico impuesto por la presencia de cadmio (como CdCl_2) o selenio (como Na_2SeO_3) en la solución de nutrientes y sobre el posible efecto protector del selenio contra la fitotoxicidad de cadmio, mediante el análisis de compuestos fenólicos en los extractos de la planta, evaluación de su capacidad antioxidante y empleo de herramientas de análisis multivariante.
- Desarrollar un nuevo procedimiento de especiación analítica de iones fosfito y ortofosfato basado en la separación por cromatografía de líquidos y detección específica de fósforo por ICP-MS para su aplicación en el análisis de plantas.
- Desarrollar un nuevo procedimiento espectrofotométrico con el uso de estándar interno, para la determinación de ácido giberélico en productos agroquímicos y también demostrar su confiabilidad mediante la comparación de los resultados con los obtenidos por cromatografía de líquidos y de gases.
- Aplicar el marcaje de auxinas con derivados de BODIPY para su análisis por cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica.

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

III.1. EQUIPO DE LABORATORIO

III.1.1. Instrumentación analítica

- Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500ce de Agilent Technologies, con celda de colisiones/reacciones tipo octopolo.
 - Para el análisis de especiación de fósforo se utilizó la columna cromatográfica fue Hamilton PRP-X100 (250 x 4.6 mm 5 μ m). Para la detección de fósforo, la columna estuvo conectada en línea al ICP-MS por un capilar de Teflon(0.3 mm d.i.) y de longitud de 10 cm.
- Cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin Elmer equipado con detector de ionización en flama y la columna cromatográfica fue ZB-5 de 30m, 0.25mm de diámetro interno, 0.25 μ m de grosor de película, Phenomenex®
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de Agilent Technologies equipado con automuestreador con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y detector fluorimétrico.
 - La columna cromatográfica para la determinación de compuestos fenólicos y ácido giberélico fue Luna C18 de 250 mm, 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula Phenomenex®.
 - La columna cromatográfica para la determinación de auxinas con derivados de BODIPYs fue Gemini C-18 de 150mm, 3mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula Phenomenex®.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1050 de Hewlett Packard con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos.
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Spectronic 3000 Milton Roy con detector de arreglo de diodos.

III.1.2. Equipos utilizados en procesamiento de muestra y/o preparación de reactivos

- Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS.
- Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura)
- Liofilizador modelo 10-269 de Labconco y frasco Fast-Freeze 600 ml Labconco
- Polythron con rotor de acero
- Centrifuga

- Speed Vac Vacufuge plus, Eppendorf
- Bloque de calentamiento Multi-Block, Barnstead/Labline

III.2. REACTIVOS Y ESTÁNDARES.

III.2.1. Reactivos y estándares para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

- Todos los estándares de compuestos fenólicos fueron de Sigma-Aldrich: ácido benzoico, 4-hidroxibenzaldehído, resorcinol, ácido salicílico, vainilina, ácido cinámico, ácido 3-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzoico, siringaldehído, ácido 3,4-dimetoxibenzoico, ácido 2,3-di-hidroxibenzoico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido 2,5-di-hidroxibenzoico, ácido *trans*-2-hidroxicinámico, ácido protocatecuico, ácido shikímico, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, ácido homogentísico, ácido *trans*-3-hidroxicinámico, ácido quínico, ácido siríngico, ácido *p*-coumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico, ácido clorogénico y ácido *o*- anísico.
- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) también de Sigma.
- N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano (BSTFA-TMCS) de Supelco.

III.2.2. Reactivos y estándares para la especiación de fosfito y fosfato

- Metanol grado HPLC (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA).
- El fosfato dibásico de sodio [P(V)], fosfito de sodio [P(III)], ftalato de hidrogeno y potasio, ácido nítrico, EDTA, tubos de 3mL Supelclean LC-18 SPE de Supelco y filtros IC Acrodisc de 0.2 μ m fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

III.2.3. Reactivos y estándares para la determinación de ácido giberélico

- Ácido giberélico, BSTFA-TMCS, fosfato de amonio dibasico, hidróxido de amonio, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol, Azul nilo, Mordiente azul I, Vede brillante, Rojo Congo y Azul de metileno, reactivos Sigma®.
- Ácido clorhídrico 12N, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, metil etil cetona y metil isobutil cetona, Karal® grado A.C.S.

- Ácido fosfórico 85%, Piridina $\geq 99.8\%$ (GC) de Fluka®

III.2.4. Reactivos y estándares para la determinación de auxinas con BODIPYs

- 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY, 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(o-hidroximetil fenil) BODIPY y 8-(2-hidroxi etoxi) BODIPY, sintetizados y proporcionados por el laboratorio del Dr. Eduardo Peña Cabrera.
- Ácidos indolacético, indolbutírico y naftalenacético, Sigma®.
- Ácido acético, trietilamina, dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) de Sigma-Aldrich®.
- Acetonitrilo, metanol, diclorometano HPLC, J.T. Baker®.

III.3. SOFTWARE

- GRAMS/AI® versión 8.0 de Thermo Electron Corporation®.
- Microsoft® Office Excel 2007®.
- Agilent Chemstation: LC and CE systems software.
- Thermo Scientific Grams Spectroscopy software version 7.1
- Statistica (StatSoft Inc. Tulsa OK)
- Unscrambler 7.5 (Camo, Norway).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR IONIZACIÓN EN FLAMA.

IV.1.1. Introducción

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, donde se presentan en forma libre, o unidos como ésteres o glicósidos, siendo estos últimos componentes de las paredes celulares. Para la determinación de estos compuestos se requiere su liberación de las uniones; es por ello que el procedimiento se lleva a cabo en las siguientes etapas: (1) extracción/fraccionamiento; (2) hidrólisis; (3) separación cromatográfica con diferentes tipos de detección. Con el fin de extraer los compuestos fenólicos de muestras biológicas se han reportado diferentes procedimientos, basados en el uso de extractantes acuosos y de solventes orgánicos tales como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo entre otros. Se han explorado las posibles ventajas de la extracción asistida mediante la aplicación de ultrasonido, energía de microondas, o el uso de fluidos supercríticos. Por otro lado, para liberar los compuestos unidos es indispensable realizar una hidrólisis por lo que se menciona en la literatura el uso de soluciones a base de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio para realizar esta tarea [83, 84].

Después de la etapa de tratamiento de la muestra, la separación y cuantificación de los compuestos fenólicos puede llevarse a cabo mediante diferentes tipos de cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica, espectrofluorimétrica, electroquímica o por espectrometría de masas; se ha reportado también las aplicaciones de cromatografía de gases acoplada a detectores de ionización en flama o espectrometría de masas [42, 85, 86]. De manera general, las metodologías que se acaban de mencionar han sido desarrolladas para responder una pregunta concreta de relevancia biológica y por lo tanto incluyen solamente algunos compuestos de interés; es por ello que en general se han reportado los procedimientos para el análisis de cinco a diez compuestos, mientras que pocos trabajos han sido enfocados a mayor número de compuestos, hasta 22. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de estudios reportados en la literatura.

Tabla 1 Algunos ejemplos de metodologías analíticas empleadas para el análisis de compuestos fenólicos en material de plantas.

Planta	Técnica analítica	No. de compuestos	Referencia
<i>Hippophaë rhamnoides</i>	HPLC-DAD	9	[87]
<i>Arachis hypogaea L.</i>	HPLC-DAD	5	[30]
<i>Populus tremula</i>	Microscopia confocal	Compuestos fluoresc.	[88]
<i>Mentha spicata</i>	GC-MS	6	[89]
<i>Citrus unshiu Marc</i>	HPLC-DAD	7	[84]
<i>Garcinia mangostana L.</i>	GC-MS	8	[90]

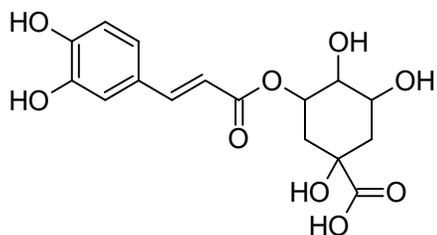
En este trabajo se propone un método de separación y cuantificación de un total de 29 compuestos fenólicos mediante cromatografía de gases con detector de ionización en flama, buscando el tiempo más corto posible de separación y buena sensibilidad. Asimismo, el enfoque ha sido en el desarrollo de procedimientos versátiles de extracción y de hidrólisis. El desarrollo de procedimientos de estas características permitirá su aplicación en el análisis de cualquier material biológico, cubriendo la mayoría de compuestos fenólicos de interés actual, esto de acuerdo a lo reportado en la literatura. En la Figura 3 se presentan de manera esquemática las estructuras de compuestos elegidos.

Estructura base	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre
	H	H	H	H	Ác. benzoico
	OH	H	H	H	Ác. salicílico
	H	OH	H	H	Ác. 3-hidroxibenzoico
	H	H	OH	H	Ác. 4-hidroxibenzoico
	H	OCH ₃	OCH ₃	H	Ác. 3,4-dimetoxibenzoico
	H	OH	OH	H	Ác. protocatecuico
	OH	OH	H	H	Ác. 2,3-dihidroxibenzoico
	OH	H	H	OH	Ác. 2,5-dihidroxibenzoico
	H	OCH ₃	OH	H	Ác. vanílico
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ác. siríngico
H	OH	OH	OH	Ác. gálico	

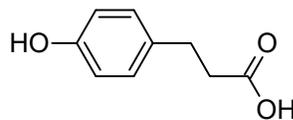
Estructura base	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre
	H	H	H	H	Ác. cinámico
	H	H	OH	H	Ác. <i>p</i> -coumárico
	H	OCH ₃	OH	H	Ác. ferúlico
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ác. sinápico
	OH	OH	H	H	Ác. <i>trans</i> 2-hidroxicinámico
	H	OH	H	H	Ác. <i>trans</i> 3-hidroxicinámico
	H	OH	OH	H	Ác. cafeico

Estructura base	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre
	H	H	OH	H	4-hidroxi-benzaldehído
	H	OCH ₃	OH	H	Vainilina
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Siringaldehído

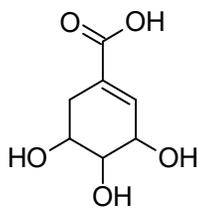
Estructura base	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre
	OH	H	H	OH	Ác. homogentísico
	H	OH	OH	H	Ác. 3,4-dihidroxi-fenilacético
	H	OCH ₃	OH	OH	Ác. homovanílico



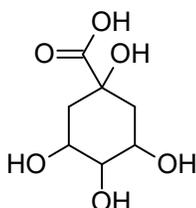
Ác. clorogénico



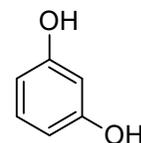
Ác. 3-(4-hidroxi-fenil)propiónico



Ác. shikímico



Ác. quínico



Resorcínol

Figura 3 Presentación esquemática de las fórmulas de compuestos fenólicos considerados en este trabajo.

IV.1.2. Objetivo

Desarrollar un nuevo procedimiento analítico que permita determinar 29 compuestos fenólicos presentes en plantas mediante cromatografía de gases con detección por ionización en flama, teniendo como criterio un corto tiempo de análisis y buena sensibilidad.

IV.1.3. Parte experimental

Se preparó una mezcla de estándares de compuestos fenólicos a una de concentración 200 mg L⁻¹ la cual fue disuelta en piridina. Con el fin de convertir los compuestos fenólicos en las especies volátiles, se llevó a cabo la derivatización con la mezcla de BSTFA-TMCS [91]. Las condiciones de la reacción de derivatización fueron adaptadas de la bibliografía; en concreto se tomaron 200 µL de la solución de estándares, se agregaron 200 µL de la mezcla comercial BSTFA + TMCS y la reacción se llevó a cabo a 70 °C, durante 15 min [91].

Se analizaron muestras de plantas provenientes de otros estudios realizados en nuestro laboratorio. En concreto, como ejemplo de la planta expuesta a estrés abiótico se utilizaron dos muestras de *Lepidium sativum* sembradas en hidroponía en la solución nutriente Hoagland, sin agregar ion cadmio (planta control) y en presencia de 0.5 mg L⁻¹ de Cd(II) [92]. Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de extractos de dos variedades de la planta de jitomate: susceptible al hongo patógeno *Fusarium oxysporum* y la variedad Yaki resistente al hongo. Para ambas variedades se analizaron plantas control e infectadas con el hongo [93]. En cada uno de los casos, se llevó a cabo el fraccionamiento de los compuestos fenólicos partiendo de tejidos de plantas liofilizados y utilizando el procedimiento descrito anteriormente [93]. En breve, a partir del extracto metanólico se obtuvieron los compuestos libres, quedándose en el residuo sólido los compuestos asociados a la pared celular. Los compuestos enlazados en forma de glicósidos fueron liberados mediante una hidrólisis ácida (HCl 4M, 80°C, 1h), mientras que los fenólicos esterificados fueron hidrolizados con hidróxido de sodio (NaOH 4M, 96°C, 1h).

IV.1.4. Resultados y discusión

Esta parte de trabajo inició con el estudio de las condiciones de separación cromatográfica de los compuestos derivatizados. Para ello, se realizaron una serie de experimentos, utilizando la mezcla de estándares derivatizados (incluyendo el ácido *o*-anísico como estándar interno). En estos experimentos se examinaron diferentes flujos del gas acarreador, temperatura de inyector y detector, programa de temperatura en la columna y las condiciones de inyección, teniendo como objetivo lograr la resolución de todos compuestos en un tiempo relativamente corto. Con base en los resultados obtenidos se establecieron las condiciones para el trabajo futuro, mismas que se presentan en la Tabla 2.

En la Figura 4 se presenta el cromatograma de una mezcla de estándares en concentración 200 mg L⁻¹ de cada uno de los compuestos, registrado utilizando las condiciones seleccionadas. Como se puede observar, la separación hasta línea base de todos los compuestos se obtuvo en un tiempo de 30 min.

Se procedió con el proceso de calibración, registrando los cromatogramas en el rango de concentraciones 0 – 200 mg L⁻¹ (IS 150 mg L⁻¹). Los parámetros analíticos evaluados se presentan en la Tabla 3 mostrando valores de coeficientes de regresión lineal de 0.9972 – 0.9999, los respectivos valores de límites de detección 1 – 6 mg L⁻¹ y de límites de cuantificación de 3 – 21 mg L⁻¹.

Tabla 2 Las condiciones instrumentales seleccionadas para el análisis de los compuestos fenólicos por GC-FID.

Columna	ZB-5, 30 m, diámetro interno 0.25 mm, grosor de película 0.25 µm, Phenomenex		
Gas acarreador	Hidrógeno	Flujo	0.8 mL min ⁻¹
Inyección	Split 1:10	Volumen	1 µL
Temperatura del inyector 240 °C			
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temperatura, °C	Permanencia, min
	-	100	1
	20	130	1.5
	5	180	0
	20	340	10
Temperatura del detector	360 °C		
Gases del detector	H ₂ 45 mL min ⁻¹ ; aire 450 mL min ⁻¹		

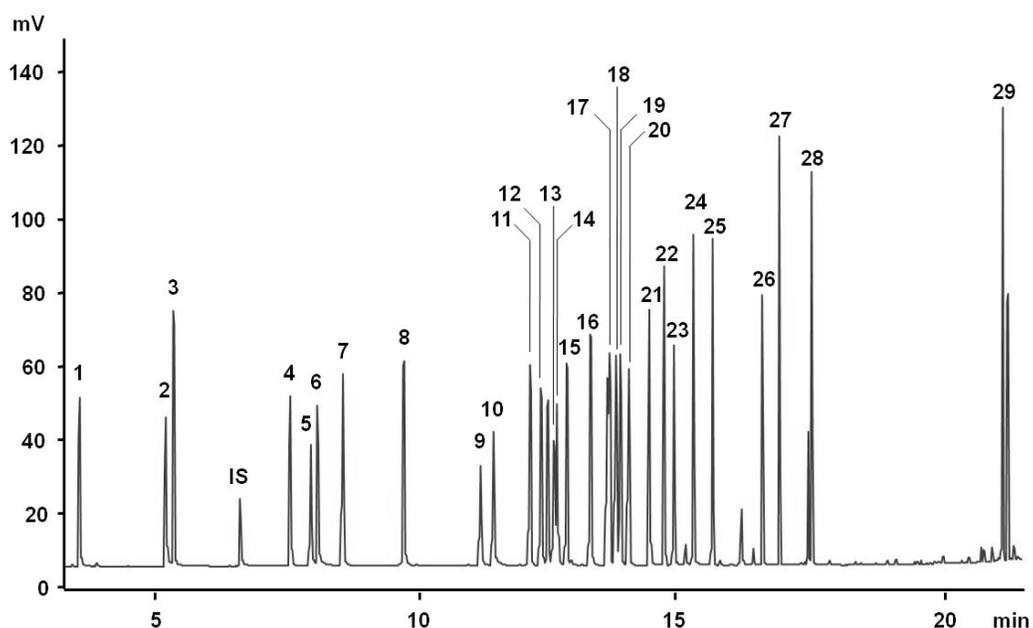


Figura 4 Cromatograma de la mezcla de estándares de los compuestos fenólicos derivatizados con BSTFA-TMCS (200 mg L⁻¹ cada uno). Ác. benzoico (1), 4-hidroxibenzaldehído (2), resorcinol (3), ác. salicílico (4), vainilina (5), ác. cinámico (6), ác. 3-hidroxibenzoico (7), ác. 4-hidroxibenzoico (8), siringaldehído (9), ác. 3,4-dimetoxibenzoico (10), ác. 2,3-dihidroxibenzoico (11), ác. 3-(4-hidroxifenil) propiónico (12), ác. vanílico (13), ác. homovanílico (14), ác. 2,5-dihidroxibenzoico (15), ác. *trans*-2-hidroxicinámico (16), ác. protocatecuico (17), ác. shikímico (18), ác. 3,4-dihidroxifenilacético (19), ác. homogentísico (20), ác. *trans* 3-hidroxicinámico (21), ác. quínico (22), ác. siringico (23), ác. *p*-coumarico (24), ác. gálico (25), ác. ferúlico (26), ác. cafeico (27), ác. sinápico (28), ác. clorogénico (29), y ác. o-anísico (IS).

Cabe mencionar que, los resultados obtenidos en este trabajo presentan un avance respecto a los reportados anteriormente [94, 95]. Así, Minuti *et al.*[94] utilizaron la separación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, obteniéndose la separación de 22 compuestos en un tiempo mayor de 40 min. Por su parte, Yhung *et al.* [95] presentaron la separación de 12 compuestos con tiempo de su separación también mayor de 40 min. En ambos trabajos sin embargo, los valores de límites de detección y cuantificación fueron mejores a los obtenidos en el presente trabajo, esto fue debido al uso de un detector másico.

Con el fin de demostrar que el procedimiento desarrollado podría ser útil en la evaluación de posibles diferencias entre perfiles de compuestos fenólicos en plantas expuestas a estrés respecto plantas control, se llevó a cabo el análisis de dos tipos de plantas. En esta parte inicial del trabajo se utilizó el protocolo de fraccionamiento reportado en la bibliografía [93], en donde fue posible encontrar compuestos de tipo ácido como salicílico, cinámico, 3-hidroxibenzoico,

3,4-dimetoxibenzoico, 3-(4-hidroxifenil) propiónico, vanílico, *trans* 2-hidroxicinámico, *trans* 3-hidroxicinámico, homovanílico, homogentísico, *p*-coumárico, gálico y ferúlico, se encontraron otros compuestos que no son de tipo ácido como la vainilina y el siringaldehído. En la Figura 5 se presentan los resultados de la cuantificación de algunos ácidos (benzoico, 4-hidroxibenzoico, vanílico, *p*-coumárico, homogentísico, ferúlico y cafeico) que presentaron cambios en ambas fracciones de los extractos de *L. sativum* expuesto a Cd(II) y en planta control. En esta Figura se observa una clara tendencia hacia disminución de los niveles de fenólicos solubles en planta expuesta respecto planta control. Por su parte, los niveles de compuestos fenólicos en la fracción insoluble tienden a aumentar en la planta expuesta, sugiriendo que la presencia de Cd(II) podría activar la defensa de planta en términos de la síntesis de ligninos para fortalecimiento de la barrera física contra el acceso del ion estresor.

Los resultados obtenidos en el análisis de compuestos fenólicos en la planta de jitomate se presentan en la Figura 6. En este caso, también se pueden observar diferencias entre los niveles de concentración de compuestos fenólicos en las dos diferentes fracciones extraídas de la planta, entre variedades Monika (susceptible al hongo) y Yaki (resistente) y también entre las plantas expuestas al estrés biótico (infectadas con hongo) respecto a las plantas control.

Tabla 3 Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos.

#	Compuesto	T _{ret} ± DE	Función calibración	R ²	LD	LC
1	Ác. benzoico	3.60±0.06	A=0.731C + 0.026	0.9995	2.22	14.81
2	4-hidroxibenzaldehído	5.25±0.04	A=0.985C + 0.092	0.9972	6.42	42.81
3	Resorcinol	5.39±0.03	A=1.661C + 0.017	0.9992	2.81	18.74
4	Ác. salicílico	7.61±0.03	A=1.227C + 0.005	0.9996	2.06	13.74
5	Vainilina	8.00±0.03	A=0.909C - 0.066	0.9984	4.29	28.61
6	Ác. cinámico	8.13±0.06	A=1.248C - 0.050	0.9991	3.02	20.14
7	Ác. 3-hidroxibenzoico	8.60±0.03	A=1.415C - 0.007	0.9999	0.94	6.28
8	Ác. 4-hidroxibenzoico	9.76±0.03	A=1.546C + 0.001	0.9998	1.40	9.36
9	Siringaldehído	11.21±0.04	A=0.834C - 0.027	0.9993	2.61	17.43
10	Ác. 3,4-dimetoxibenzoico	11.46±0.07	A=1.123C - 0.056	0.9992	2.73	18.22
11	Ác. 2,3-dihidroxibenzoico	12.15±0.02	A=1.668C + 0.019	0.9996	1.83	12.22
12	Ác. 3-(4-hidroxifenil) propiónico	12.36±0.03	A=1.459C - 0.008	0.9997	1.63	10.89
13	Ác. vanílico	12.60±0.02	A=1.328C + 0.011	0.9996	2.04	13.60
14	Ác. homovanílico	12.66±0.03	A=1.301C + 0.003	0.9995	2.24	14.92
15	Ác. 2,5-dihidroxibenzoico	12.84±0.02	A=1.673C + 0.025	0.9994	2.38	15.84
16	Ác. <i>trans</i> -2-hidroxicinámico	13.29±0.03	A=1.800C - 0.002	0.9997	1.67	11.10
17	Ác. protocatecuico	13.72±0.02	A=1.505C + 0.038	0.9993	2.83	18.89
18	Ác. shikímico	13.76±0.03	A=1.764C + 0.034	0.9994	2.42	16.14
19	Ác. 3,4-dihidroxifenilacético	13.86±0.03	A=1.666C + 0.023	0.9995	2.19	14.61
20	Ác. homogentísico	14.01±0.03	A=1.603C + 0.022	0.9996	2.02	13.47
21	Ác. <i>trans</i> -3-hidroxicinámico	14.41±0.04	A=1.615C - 0.003	0.9996	2.02	13.50
22	Ác. quínico	14.69±0.03	A=1.857C + 0.041	0.9993	2.61	17.37
23	Ác. siríngico	14.86±0.03	A=1.106C + 0.016	0.9993	2.61	17.39
24	Ác. <i>p</i> -coumárico	15.24±0.03	A=1.568C - 0.004	0.9994	2.34	15.61
25	Ác. gálico	15.60±0.02	A=1.420C + 0.031	0.9992	2.75	18.32
26	Ác. ferúlico	16.54±0.04	A=1.002C - 0.022	0.9994	2.49	16.58
27	Ác. cafeico	16.87±0.03	A=1.406C + 0.009	0.9995	2.30	15.32
28	Ác. sinápico	17.48±0.03	A=1.373C + 0.012	0.9993	2.55	16.98
29	Ác. clorogénico	21.11±0.02	A=1.820C - 0.010	0.9992	2.23	14.90

- número de compuesto de acuerdo al orden de elución; T_{ret} - tiempo de retención con respectivo valor de DE evaluado con base en cinco inyecciones no-sucesivas, min; función de calibración: A - relación entre áreas de los picos del analito e IS, c - concentración del compuesto en la solución inyectada, mg L⁻¹; LD - límite de detección con base en S/R=3, mg L⁻¹ (solución introducida en la columna); LC - límite de cuantificación en material de planta, mg g⁻¹ (muestra liofilizada).

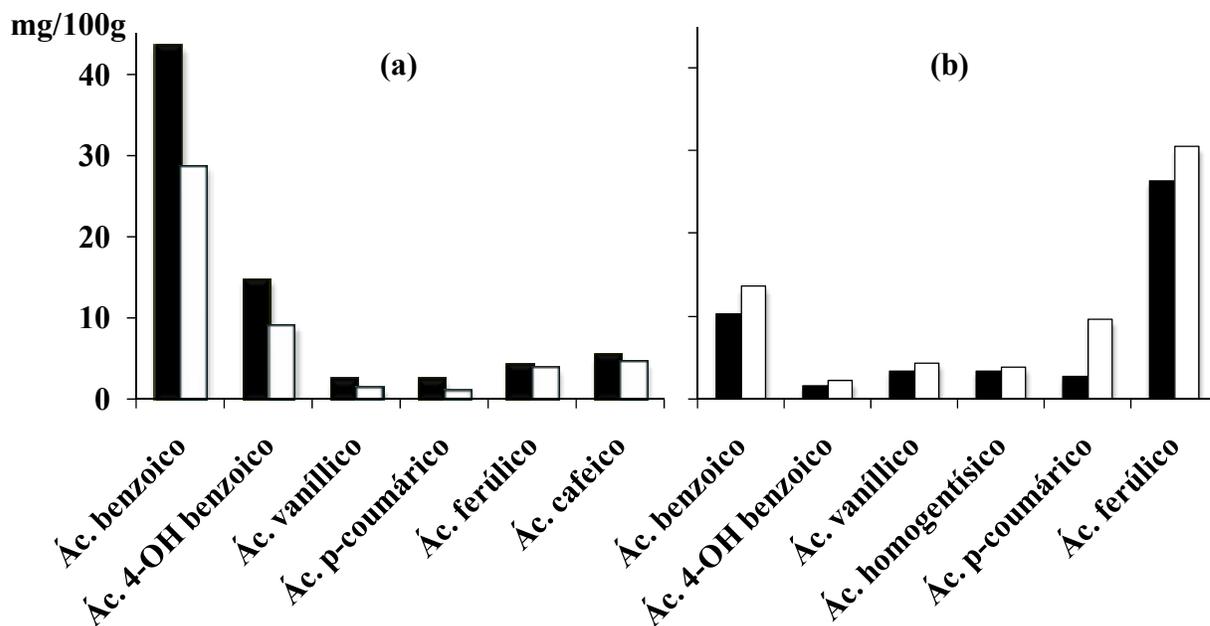


Figura 5 Niveles de concentración de algunos ácidos fenólicos, encontrados en extractos de *Lepidium sativum*: (a) fracción de compuestos solubles y (b) fracción de compuestos insolubles (negro – planta control; blanco – planta expuesta a Cd(II); valores de concentración de ácidos en mg/100g del material liofilizado de planta).

De manera similar como en *L. sativum*, los resultados obtenidos parecen indicar que el mantenimiento de la integridad de la pared celular es un mecanismo defensivo contra el acceso del agente patogénico a la planta, de acuerdo con lo reportado anteriormente [96, 97]. Cabe mencionar que, en el caso de las plantas de jitomate, los resultados obtenidos utilizando el procedimiento GC-FID propuesto en este trabajo confirmaron los anteriores arrojados por cromatografía de líquidos sin derivatización pre-columna [93]. De manera general, estos experimentos preliminares que se acaban de describir mostraron la capacidad del procedimiento GC-FID para cuantificar y detectar diferencias entre contenidos de los compuestos fenólicos en extractos de plantas que crecieron en diferentes condiciones, de acuerdo con el objetivo propuesto.

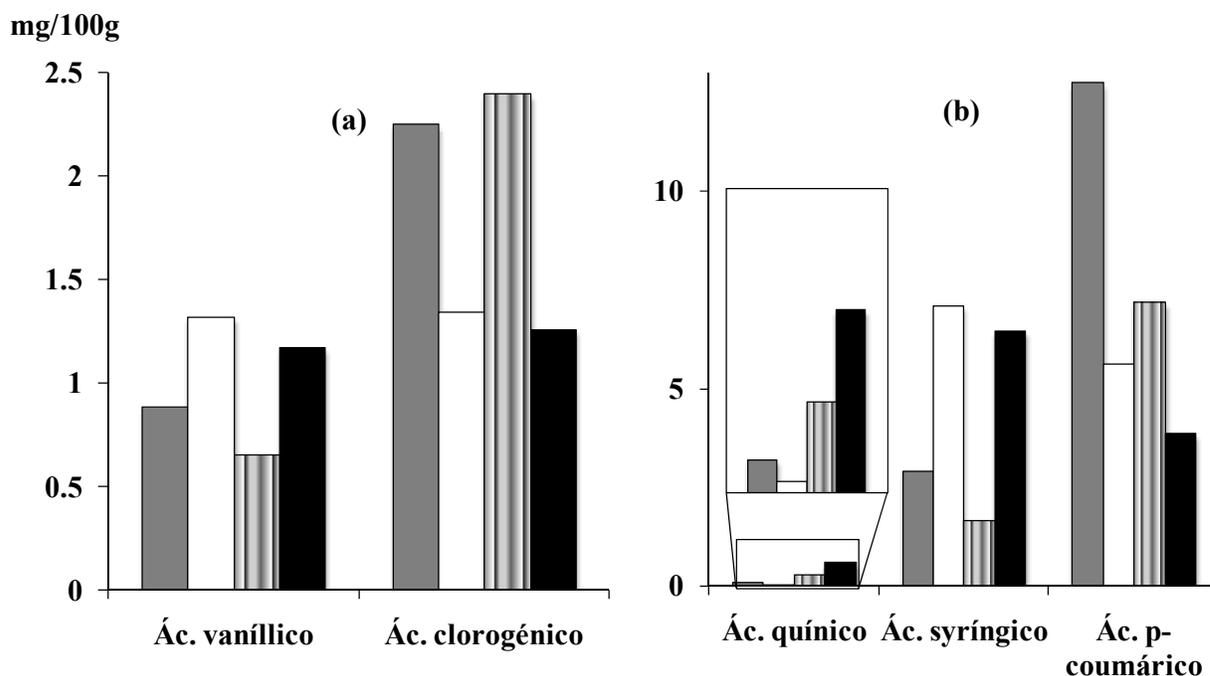


Figura 6 Niveles de concentración de algunos ácidos fenólicos, encontrados en extractos de dos variedades de la planta de jitomate (Monika y Yaki): (a) fracción de compuestos solubles y (b) fracción de compuestos insolubles (Monika control , Monika infectada , Yaki control  y Yaki infectada ).

IV.1.5. Conclusiones

En esta parte del trabajo se ha puesto a punto un procedimiento de determinación de hasta 29 compuestos fenólicos, mediante su derivatización pre-columna con BSTFA-TMCS y el análisis por GC-FID. Las principales ventajas del procedimiento son: (1) resolución cromatográfica prácticamente de todos compuestos fenólicos de interés común en el análisis de plantas, en un corto tiempo de 30 min y (2) límites de cuantificación de 6 a 42 mg g⁻¹ (muestra liofilizada), suficientemente bajos para la cuantificación de estos compuestos en distintos tipos de muestras de plantas. La viabilidad del procedimiento en estudios de la respuesta de plantas a estrés, ha sido demostrada mediante el análisis de extractos de diferentes plantas crecidas en presencia de Cd(II) o infectadas con *F. oxysporum*, donde se observaron diferentes perfiles de compuestos fenólicos respecto a los perfiles obtenidos en plantas control.

IV.2. IMPACTO DE LOS IONES CADMIO, SELENITO Y MEZCLA DE LOS DOS EN EL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN *LEPIDIUM SATIVUM*

IV.2.1. Introducción

La segunda etapa de trabajo ha sido enfocada en demostrar la utilidad del procedimiento GC-FID en un estudio analítico que permita entender mejor la respuesta de plantas al estrés abiótico, causado por la presencia de metales. Se decidió trabajar con la planta *Lepidium sativum* cultivada bajo diferentes condiciones de su exposición a Se(IV) (como selenito de sodio), Cd(II) (como cloruro de cadmio) o mezcla de los dos iones estresantes. El presente trabajo forma parte de un estudio de mayor alcance que esta tesis, cuyo principal objetivo es entender si el selenio ejerce un efecto protector contra la fitotoxicidad de cadmio en esta planta, y en caso de ser afirmativo tratar de dar una respuesta a cómo realiza esta función [92]. *L. sativum* fue elegido como modelo biológico del estudio por los siguientes razones: (1) pertenece a la familia Brassicaceae, en la que diferentes especies presentan habilidad de acumular el selenio; (2) ha sido utilizada como biomarcador de metales pesados en estudios ecotoxicológicos; (3) se cultiva en hidroponía con un rápido crecimiento y buena producción de biomasa; (4) no se ha encontrado información sobre efectos de selenio y cadmio en esta planta.

Como antecedente de este trabajo hay que mencionar los resultados del estudio anterior [92], en el que se demostró que la fitotoxicidad de Cd(II) en *Lepidium sativum* se manifiesta mediante la inhibición de crecimiento, disminución de los niveles de los micronutrientes minerales (Zn, Mn y Cu) y el incremento de estrés oxidativo. La exposición de la planta a Se(IV) provocó efectos similares, pero menos notorios. En presencia de ambos elementos (Cd(II) + Se(IV)), los efectos adversos observados en la exposición a un solo elemento disminuyeron. En particular, se observó claramente el efecto protector de Se(IV) en términos de mejor crecimiento, mayores niveles de concentración de micronutrientes, más bajas concentraciones de malondialdehído y mayor insaturación de los ácidos grasos respecto a los cultivos expuestos a Cd(II). Este efecto fue más notorio en cultivos expuestos a 0.5 mg L^{-1} de ambos elementos. Es también relevante que la captación de Cd(II) y Se(IV) en *L. sativum* incrementaba conforme se aumentó la concentración de cada uno de ellos en el medio de crecimiento, sin embargo en la exposición simultánea a Cd(II) + Se(IV), los niveles de ambos elementos en la planta disminuyeron [92].

Para obtener más información sobre la respuesta de la planta a Se(IV), Cd(II) y Se(IV) + Cd(II), se decidió obtener plantas crecidas en presencia de un mayor intervalo de concentraciones de ambos iones y evaluar el efecto de estos iones en los perfiles de compuestos fenólicos y en la capacidad antioxidante de la planta. La identificación/cuantificación de los compuestos fenólicos y su asociación con el poder antioxidante han sido estudiados en diferentes tipos de plantas [98-100].

En este trabajo se obtuvieron 12 cultivos hidropónicos correspondientes a diferentes condiciones de exposición a Cd(II), Se(IV) y Cd(II) + Se(IV) y un cultivo control. Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento de la biomasa, obteniéndose cuatro fracciones de los compuestos fenólicos: (1) fenólicos libres, (2) solubles enlazados en forma de glicósidos, (3) unidos a la pared celular como ésteres y (4) unidos a la pared celular como glicósidos. En cada uno de los extractos se determinaron los compuestos fenólicos por GC-FID y se evaluó el poder antioxidante del extracto metanólico utilizando el ensayo espectrofotométrico. Los resultados obtenidos en diferentes condiciones de exposición fueron evaluados y comparados empleando herramientas estadísticas como estadística descriptiva, prueba t y el método de componentes principales (PCA). Para complementar el estudio, se seleccionaron 13 compuestos, mismos que fueron determinados en los extractos (1) y (2) por cromatografía de líquidos. Para estos compuestos, se evaluó la capacidad antioxidante individual y los resultados obtenidos fueron comparados estadísticamente con aquellos obtenidos por el ensayo espectrofotométrico directamente en los extractos de la planta. Los datos obtenidos permitieron formular una serie de conclusiones que contribuyen en el mejor entendimiento de los efectos de cadmio y selenio así como del efecto protector del selenio en *L. sativum*.

IV.2.2. Objetivo

Avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de la planta *Lepidium sativum* al estrés abiótico impuesto por la presencia de cadmio (Cd(II) como CdCl₂) o selenio (Se(IV) como Na₂SeO₃) en la solución de nutrientes y sobre el posible efecto protector del selenio contra la fitotoxicidad de cadmio, mediante el análisis de compuestos fenólicos en los extractos de la planta, evaluación de su capacidad antioxidante y empleo de herramientas de análisis multivariante.

IV.2.3. Parte experimental

Muestras biológicas

Se obtuvieron trece cultivos hidropónicos de *Lepidium Sativum*, siguiendo el procedimiento descrito previamente [92]; al inicio las semillas se dejaron en germinar en medio Hoagland hasta cumplidos cinco días, posteriormente cuatro de ellos fueron expuestos a Cd(II) mediante la adición de 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 mg L⁻¹ Cd(II) al medio de cultivo Hoagland; cuatro otros fueron expuestos a Se(IV) con concentraciones de este ión 0.2; 0.5; 1.0; 2.0 mg L⁻¹ en la solución Hoagland; cuatro fueron expuestos de manera simultánea a los dos iones 0.5 + 0.5; 0.5 + 2.0; 2.0 + 0.5; 2.0 + 2.0 mg L⁻¹ de Cd(II) y Se(IV), respectivamente y un cultivo que no fue expuesto a estos metales fue utilizado como control. Las plantas de cada uno de los cultivos se tomaron a una etapa de crecimiento y desarrollo (21 días), fueron lavadas con agua desionizada, homogeneizadas y liofilizadas.

Fraccionamiento de compuestos fenólicos y su determinación por GC-FID

En cada una de las muestras liofilizadas se llevó a cabo el fraccionamiento de los compuestos fenólicos, adoptando el procedimiento utilizado anteriormente [93]. El esquema detallado se presenta en la Figura 7. En breve, a partir del extracto metanólico de la biomasa liofilizada se obtuvieron los compuestos solubles (libres y en forma de glicosidos solubles), quedándose en el residuo sólido los compuestos asociados a la pared celular. Los compuestos enlazados en forma de glicósidos fueron liberados mediante una hidrólisis ácida (HCl 4M, 80°C, 1h), mientras que los fenólicos esterificados fueron hidrolizados con hidróxido de sodio (NaOH 4M, 96°C, 1h). Todos los extractos fueron analizados por GC-FID descrito en la sección III.1.3. Parte experimental de este documento.

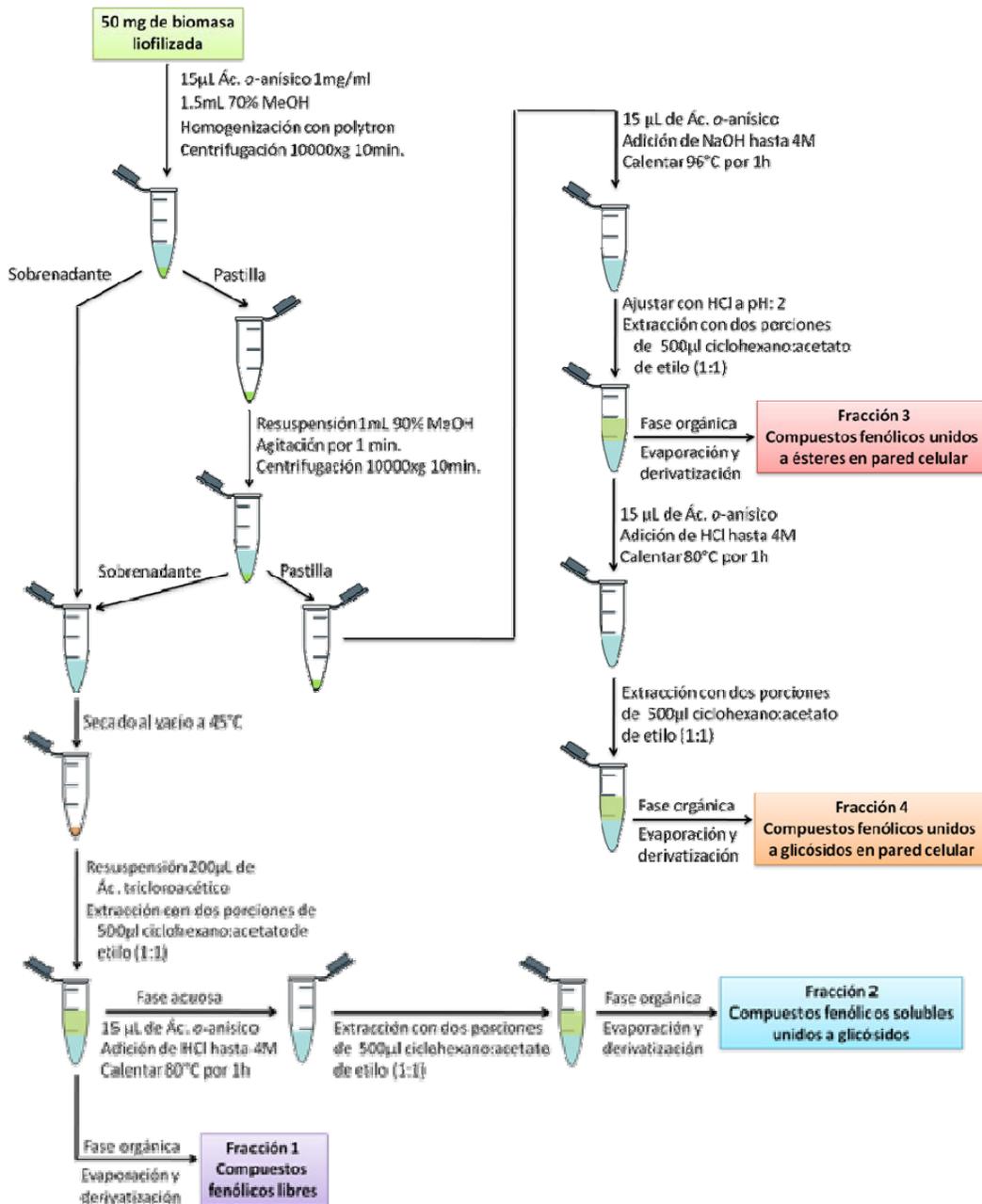


Figura 7 Esquema de fraccionamiento de los compuestos fenólicos en material de planta.

Ensayo espectrofotométrico de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante fue evaluada en el extracto metanólico de la biomasa, mediante el ensayo espectrofotométrico con ABTS [101]. Para ello, se preparó una solución de ABTS a una concentración 7.04 mM, la solución de persulfato de potasio a concentración 2.45 mM y el tampón de fosfatos 1.0 M pH 7 (fosfato ácido de potasio 1 M y fosfato básico de potasio 1 M en relación 1:1(v/v)). Para obtener el ABTS en forma del radical libre (ABTS[•]), se mezcló la solución de ABTS y la solución de persulfato de potasio en relación 1:1(v:v) y se dejó reaccionar durante 16 horas. Posteriormente, se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 1.0 ± 0.2 a 735 nm. Puesto que la mezcla es inestable, siempre se preparó fresca, antes de usarse. La calibración se llevó a cabo con el ácido gálico, para lo cual se preparó una serie de las soluciones estándar con las concentraciones de 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 mg L⁻¹ o expresado como 0.0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 8.75 μM de ácido gálico en metanol al 75% (v/v). Para el análisis de las muestras, se tomaron 100 mg del material liofilizado, la extracción se llevó a cabo con 2 mL de metanol al 75%, agitación con el uso de vórtex durante cinco minutos. La mezcla se centrifugó a 10000xg durante diez minutos y el sobrenadante fue diluido diez veces (100 μL a 1 mL). Para el ensayo espectrofotométrico se tomaron 20 μL del extracto metanólico de muestra (20 μL de la solución estándar del ácido gálico para la calibración), se le adicionaron 10 μL del tampón de fosfatos, 50 μL de la solución de ABTS[•] y 120 μL de agua.

La solución se mezcló y dejó reaccionar durante un minuto. Se registraron las absorbancias a 735 nm y a 470 nm. La señal analítica fue definida como la diferencia entre los dos valores ($S = A_{735\text{nm}} - A_{470\text{nm}}$), eliminando de esta manera el posible efecto de la turbidez de las muestras. La curva de calibración fue obtenida por el método de mínimos cuadrados como $S = f(c)$, donde c corresponde a la concentración del ácido gálico en mg L⁻¹; consecuentemente los resultados de capacidad antioxidante en muestras reales se presentan en ng o nmol de ácido gálico por un miligramo de material liofilizado.

Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos

Este análisis se llevó a cabo en los extractos (1) y (2) de plantas, correspondientes a las fracciones de compuestos fenólicos libres y solubles unidos a glicósidos, respectivamente. Los compuestos de interés fueron: ácido clorogénico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido cafeico, ácido vanílico, *p*-coumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *trans*-2-hidroxicinámico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido 2,5-dihydroxibenzoico, ácido 2,3-dihydroxibenzoico, ácido salicílico y ácido *o*-anísico (como IS). La separación de estos compuestos se obtuvo mediante el uso de la columna de fase inversa Luna C18(C2) (250 x 4.6 mm, 5 μ m) con una precolumna, ambas de Phenomenex. Se utilizaron tres fases móviles: (A) agua desionizada, (B) acetonitrilo:metanol (1:1, v/v) y (C) fosfato de amonio 30 mM, pH 2.5. El volumen de inyección fue de 40 μ L, la temperatura en la columna de 35 °C, el flujo total de 1 mL min⁻¹ y la elución fue en el gradiente: 0 min: 70% A, 20% B, 10% C; 2 min: 66% A, 24% B, 10% C; 14 min: 10% A, 80% B, 10% C; 14.5 min: 70% A, 20% B, 10% C. Se utilizó la detección fluorimétrica para los ácidos 2,3-dihydroxibenzoico, 2,5-dihydroxibenzoico (λ_{ex} = 305 nm λ_{em} = 436 nm), el ácido salicílico (λ_{ex} = 305 nm λ_{em} = 407 nm) y *o*-anísico (λ_{ex} = 305 nm λ_{em} = 365 nm), mientras que para el resto de los compuestos la detección fue con el detector de arreglo de diodos (λ_{an} = 254 nm, 280 nm, 310 nm, λ_{ref} = 346 nm). El proceso de calibración se llevó a cabo utilizando una serie de soluciones metanólicas (75%, v/v) de estándares conteniendo 0.0, 1.0, 5.0, 10.0 y 15.0 mg L⁻¹ de cada uno de los compuestos y 15 μ g mL⁻¹ del IS (reactivos Sigma). La señal analítica fue definida como la relación entre las áreas de picos del analito y IS, las funciones de regresión lineal se obtuvieron por el método de mínimos cuadrados.

Tal como se mencionó al inicio, se analizaron las fracciones (1) y (2) de las muestras (Fig. 7), en este caso sin embargo se tomaron 100 mg de material liofilizado y los extractos finales secos fueron re-constituidos con 300 μ L de la fase móvil C.

Análisis estadístico

Cada uno de los análisis se llevó a cabo en triplicado, registrando siempre la señal del blanco. Para la obtención de los valores promedios y desviaciones estándar, se llevó a cabo el análisis estadístico descriptivo. Los datos fueron evaluados para posibles diferencias estadísticas utilizando test t, con el nivel de significancia $p < 0.05$. Para observar posibles relaciones entre los parámetros se realizó un análisis de componentes principales (PCA).

IV.2.4. Resultados y discusión

Para cada uno de los trece cultivos de *L. sativum* se llevó el proceso de fraccionamiento de compuestos fenólicos y el análisis de cada una de las fracciones por el procedimiento GC-FID desarrollado previamente. La identificación de compuestos fue con base en los tiempos de retención y mediante el método de adición de estándar. Los compuestos encontrados en las muestras analizadas fueron: ácido benzoico, 4-hidroxibenzaldehído, resorcinol, ácido salicílico, vainilina, ácido cinámico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, siringaldehído, ácido 3,4-dimetoxibenzoico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido *trans*-2-hidroxicinámico, ácido protocatecuico, ácido shikímico, ácido homogentísico, ácido *trans*-3-hidroxicinámico, ácido quínico, ácido syringico, ácido *p*-coumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido sinápico y ácido clorogénico. En la Figura 8 se presentan a manera de ejemplo dos cromatogramas obtenidos en el análisis de la fracción (1) del cultivo control y del cultivo expuesto a 2 mg L⁻¹ Cd(II). En esta figura se puede observar una clara tendencia hacia disminución de las concentraciones de los compuestos fenólicos libres en planta expuesta a Cd(II) respecto planta control, sugiriendo el efecto fitotóxico de este ion metálico. Se llevó a cabo la cuantificación de los compuestos fenólicos, con base en las curvas de calibración obtenidas para cada uno de ellos. De esta manera se generó una considerable cantidad de los datos, correspondientes a 29 compuestos en cuatro fracciones de cada una de las muestras para un total de 13 muestras. El manejo de estos datos se realizó utilizando las herramientas del análisis multivariante.

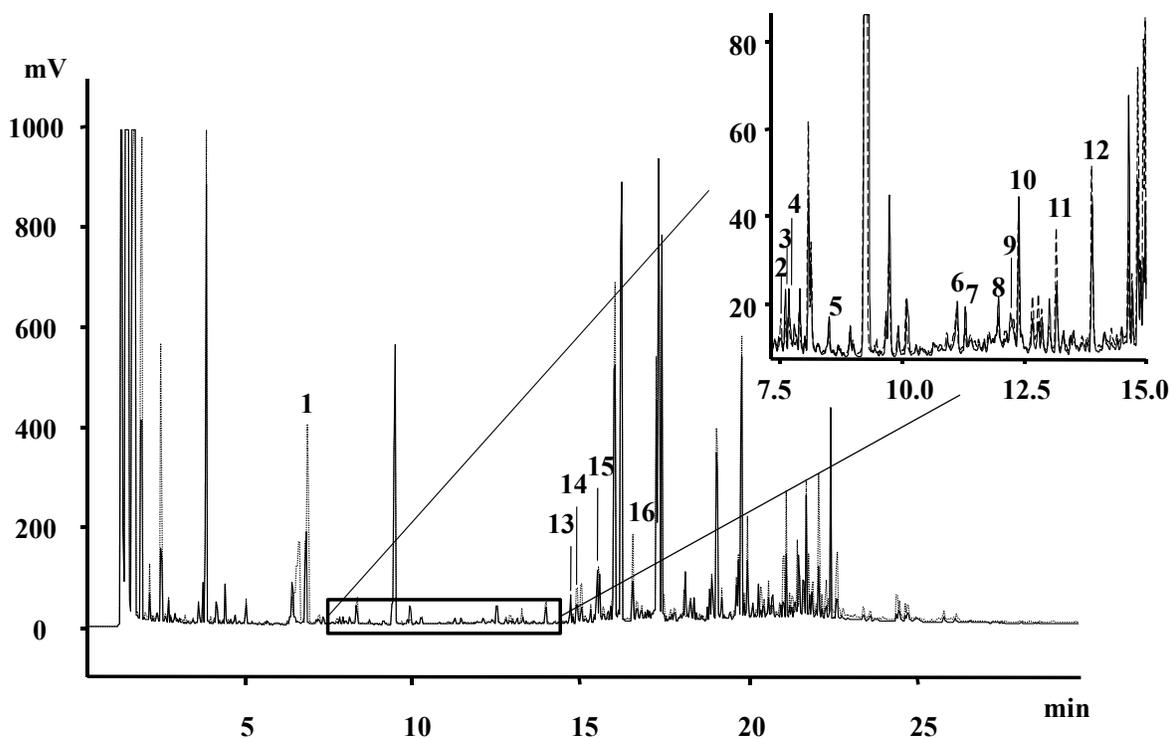


Figura 8 Cromatogramas GC-FID obtenidos en el análisis de la fracción de compuestos fenólicos libres (fracción 1) para la planta control (—) y la planta expuesta a $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd(II)}$ (---). Los compuestos encontrados fueron: (1) – ácido *o*-anisico (IS); (2) – ácido salicílico; (3) - vainilina; (4) - ácido cinámico; (5) - ácido 3-hidroxibenzoico; (6) - syringaldehído; (7) - ácido 3,4-dimetoxibenzoico; (8) – ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico; (9) – ácido vanílico; (10) – ácido homovanílico; (11) – ácido *trans*-2-hidroxicinámico; (12) – ácido homogentísico, (13) – ácido *trans*-3-hidroxicinámico; (14) - ácido *p*-cumarico, (15) – ácido gálico; (16) . ácido ferúlico.

En primer lugar, se compararon los contenidos totales de los compuestos fenólicos (suma de todos compuestos en cada cromatograma) en cuatro fracciones correspondientes a: (1) fenólicos libres, (2) solubles enlazados en forma de glicósidos, (3) unidos a la pared celular como ésteres y (4) unidos a la pared celular como glicósidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

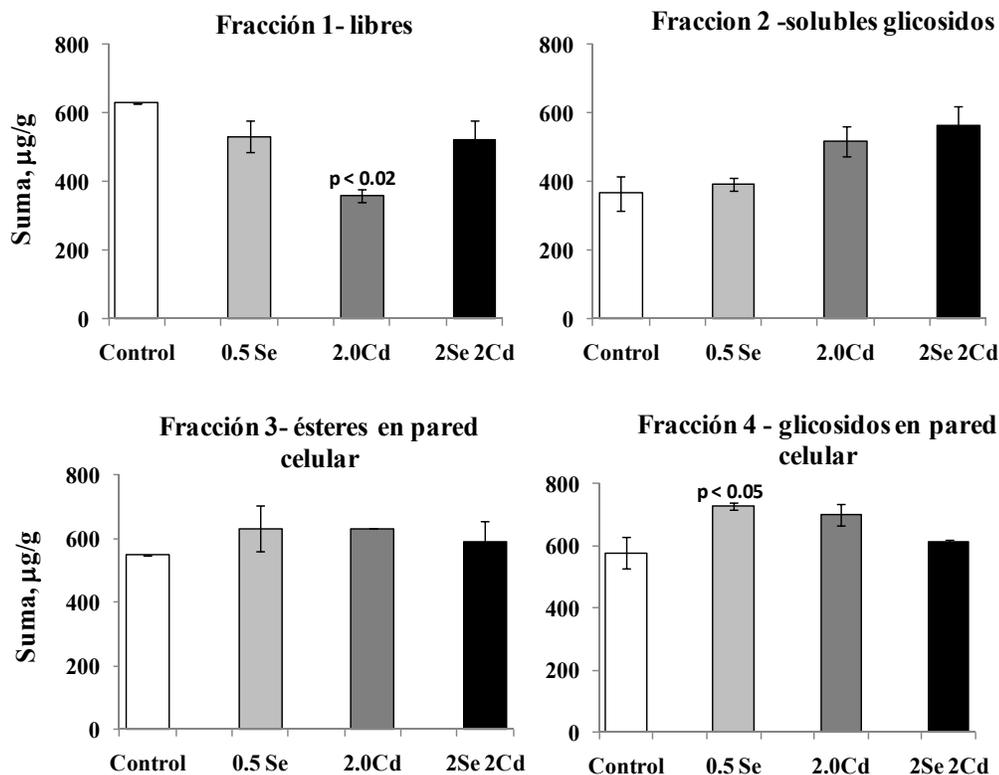


Figura 9 Concentraciones totales de los compuestos fenólicos en cuatro fracciones de *L. sativum* (μg por g de biomasa liofilizada \pm DE (n=3), dependiendo de las condiciones de la exposición a Cd(II) y Se(IV).

En esta Figura se puede observar una tendencia hacia menores cantidades de compuestos fenólicos libres (fracción 1) en presencia de Cd(II), Se(IV) y ambos estresantes, en comparación con la planta control; sin embargo, solamente en el caso de cadmio la diferencia fue estadísticamente significativa (Prueba t). Los resultados obtenidos en la fracción 2 sugieren que el estrés provocado por mayores concentraciones de estresantes (2 mg L^{-1} Cd(II) y 2 mg L^{-1} Cd(II) + 2 mg L^{-1} Se(IV)) provoca un aumento de la fracción soluble de fenólicos en forma de glicósidos, lo que podría indicar la activación de la respuesta defensiva de la planta dirigida al proceso de lignificación y con ello fortalecimiento de la barrera física contra el acceso de agentes estresantes. En este experimento, no se han detectado cambios significativos en los contenidos de fenólicos unidos a la pared celular, excepto el cultivo obtenido en presencia de 0.5 mg/L de Se(IV), donde el nivel de fenólicos totales unidos con la pared en forma de glicósidos fue significativamente más alto respecto al cultivo control. Con base en estos resultados, el trabajo se

enfocó en las fracciones 1 y 2 (compuestos fenólicos libres y solubles enlazados como glicósidos), ya que en estas dos fracciones se observaron más notorios los efectos de la exposición de la planta a Cd(II), Se(IV) o Cd(II) + Se(IV), respecto a las otras dos fracciones de los compuestos fenólicos.

Es bien establecido que los compuestos fenólicos confieren a las plantas propiedades antioxidantes. Puesto que los niveles de estos compuestos fueron afectados por las condiciones de la exposición de planta a dos iones estresantes, parecía interesante evaluar la capacidad antioxidante en cada uno de los cultivos. Para ello, se utilizó el ensayo espectrofotométrico con ABTS. Este ensayo se basa en transferencia de un electrón entre el radical del ABTS^{•+} y el antioxidante presente en el medio de la reacción, tal como se presenta en la Figura 10 [102]. La capacidad antioxidante se evaluó con base en la disminución de absorbancia en 735 nm en función de la concentración del antioxidante, de acuerdo con el protocolo descrito en la parte experimental. La calibración se obtuvo para el ácido gálico y los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales se presentan como equivalentes a nanogramos de ácido gálico por un miligramo de material liofilizado.

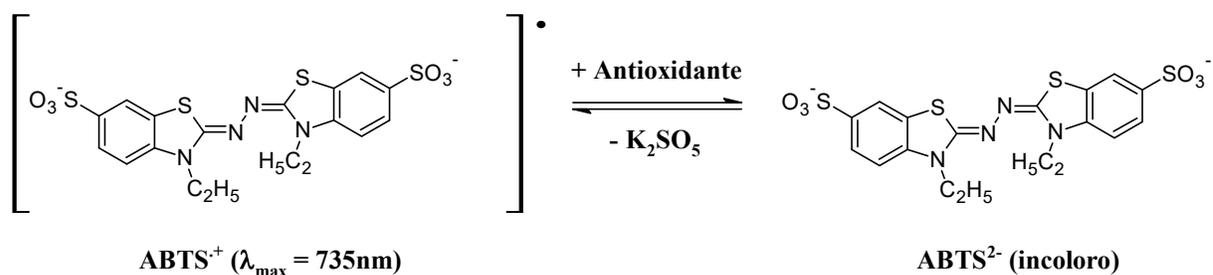


Figura 10 Esquema de la reacción en el ensayo de la capacidad antioxidante con el ABTS[102].

En la Figura 11 se presentan a manera de ejemplo dos curvas de calibración obtenidas en dos diferentes días, observándose buena linealidad y reproducibilidad de los parámetros de la función de regresión lineal. Los resultados obtenidos en el análisis de los extractos de *L. sativum* cultivado en diferentes condiciones de exposición a Se(IV) y Cd(II) se presentan en la Tabla 4.

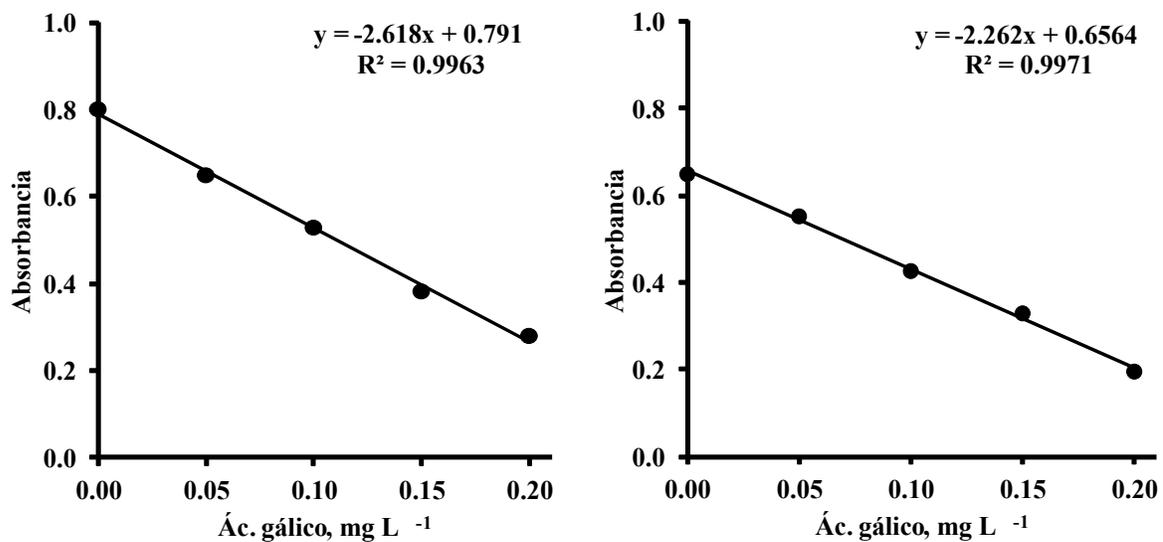


Figura 11 Ejemplos de las funciones de calibración obtenidos en el ensayo ABTS en dos diferentes días.

Tabla 4 Capacidad antioxidante evaluada en los extractos de *L. sativum* en diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV).

Concentración en el medio de crecimiento, mg L ⁻¹		Capacidad antioxidante, ng (á.gálico) / mg (m. liofilizada)
Cd(II)	Se(IV)	
0	0	16.2
0.5	0	17.5
1.0	0	18.9
2.0	0	19.7
5.0	0	20.2
0	0.2	19.0
0	0.5	19.9
0	1.0	17.9
0	2.0	18.3
0.5	0.5	17.6
0.5	2.0	17.8
2.0	0.5	17.5
2.0	2.0	19.2

Estos mismos datos se presentan gráficamente en la Figura 12 de tal manera que la Figura 12a permite observar el efecto de la exposición de la planta a diferentes concentraciones del ión cadmio, la Figura 12b corresponde al efecto de Se(IV) y la Figura 12c representa la respuesta de la planta englobando todas las condiciones de exposición.

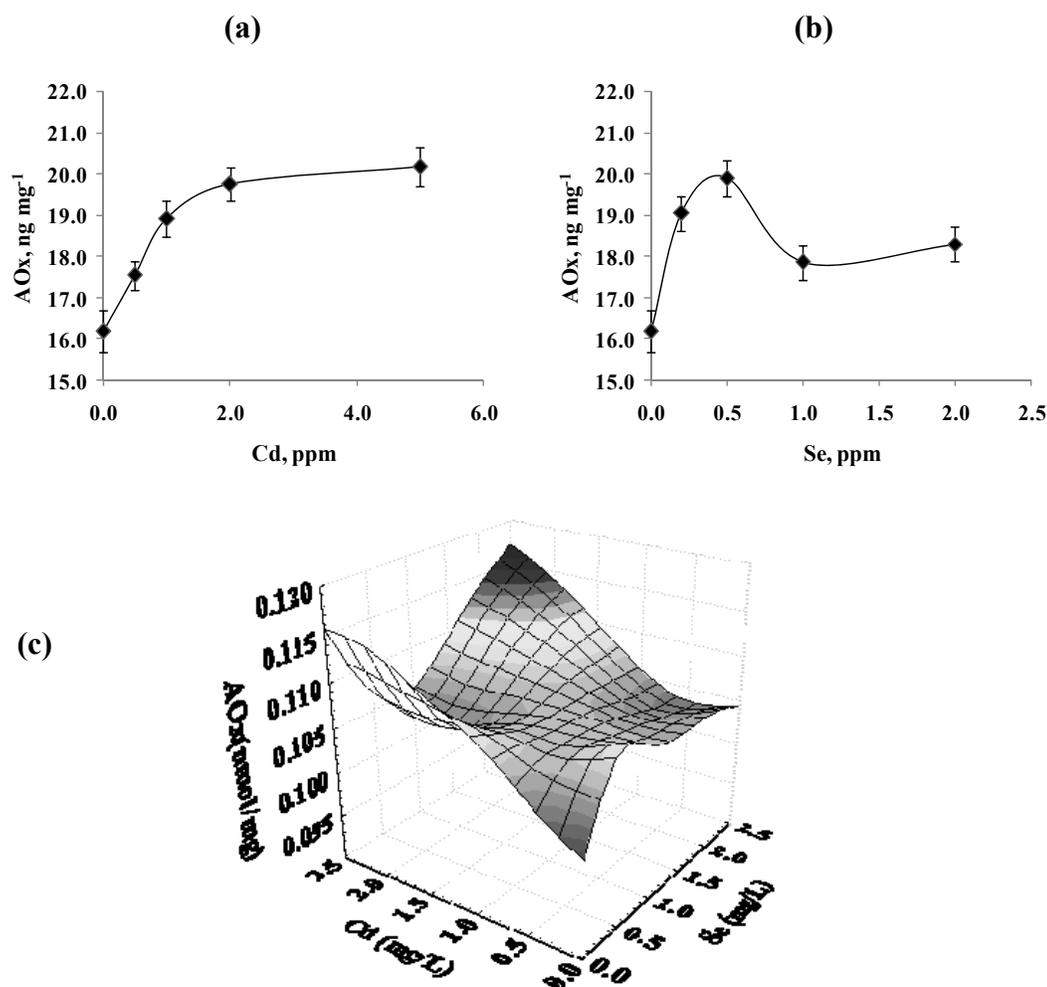


Figura 12 Efecto de la exposición de *L. sativum* en la capacidad antioxidante del extracto de la planta: (a) exposición a ion Cd(II), (b) exposición a Se(IV), (c) curva de respuesta obtenida considerando todas las condiciones de crecimiento.

Los resultados del ensayo ABTS demuestran que relativamente bajas concentraciones de Cd(II) o Se(IV) inducen la actividad antioxidante de la planta; para el cadmio la misma tendencia se mantuvo en todo el rango de las concentraciones estudiadas (Figura. 12a), mientras que en presencia de las concentración de Se(IV) mayores de 0.5 mg L⁻¹ se observó la disminución de la capacidad antioxidante con la tendencia de establecerse en nivel un poco más alto respecto al

encontrado en la planta control (Figura 12b). Parece interesante que, la exposición simultánea a los dos iones (Figura 12c), en concreto en el intervalo de concentraciones 0.5—2.0 mg L⁻¹ de ambos iones, la capacidad antioxidante fue más baja que para cada uno de los iones individuales, manteniéndose en un valor aproximadamente constante (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en *L. sativum* cultivado en presencia de Cd(II) confirman aquellos reportados para otro tipo de plantas [47, 103, 104], algunos autores observaron también efectos similares para el selenio [105, 106], sin embargo los resultados obtenidos en la exposición simultánea de la planta a los dos iones son originales. Puesto que estos resultados sugieren el efecto protector de selenio, mediante atenuación de los cambios inducidos por el cadmio, se decidió seguir con este enfoque en el trabajo futuro. Para detectar las posibles asociaciones entre todas las variables del sistema, se llevó a cabo el análisis multivariante, utilizando el método PCA. Para ello, se utilizaron las siguientes variables: **Cd** – concentración de Cd en el medio; **Se** – concentración de selenio en el medio; **AOx**- capacidad antioxidante y las concentraciones de los siguientes compuestos fenólicos encontrados en dos fracciones de biomasa (Letras en negritas – fracción 1, correspondiente a fenólicos libre y letras subrayadas – fracción 2 correspondiente a fenólicos enlazados a glicósidos): **1**- 4-hidroxibenzaldehído; **2**- resorcinol; **3**- ác. salicílico; **4**- vanillina; **5** – ác. cinámico; **6**- ác. 3-hidroxibenzoico; **7**- ác. 4-hidroxibenzoico; **8**- syringaldehído; **9**- ác. 3,4-dimethoxibenzoico; **10**- ác. 2,3-dihidroxibenzoico; **11**- ác. 3-(4-hidroxifenil)propiónico; **12**- ác. vanílico; **13**- ác. homovanílico; **14**- ác. 2,5-dihidroxibenzoico; **15**- ác. *trans*-2-hidroxicinámico; **16**- ác. protocatecuico; **17**- ác. homogentísico; **18**- ác. *trans*-3-hidroxicinámico; **19**- ác. quínico; **20**- ác. siríngico; **21**- ác. *p*-coumárico; **22**- ác. gálico; **23**- ác. ferúlico; **24**- ác. cafeico; **25**- ác. sinápico; **26**- ác. clorogénico.

El modelo PCA obtenido se presenta en la Figura 13, se puede observar que los dos primeros componentes principales describen 70% de la variabilidad total del sistema. La Figura 13a representa la estructura de los datos en el espacio de los dos primeros componentes principales (scores plot), donde se observa claramente la separación de los datos correspondientes a la fracción 1 (letras en negritas en la gráfica) de los de la fracción 2 (letras subrayadas); además el modelo aparentemente distingue los datos obtenidos para diferentes condiciones de exposición, agrupando los correspondientes a planta control y planta expuesta a 0.5 mg L⁻¹ Se(IV) de manera separada de los obtenidos para las plantas expuestas a 2 mg L⁻¹ Cd(II) y a mezcla de dos iones.

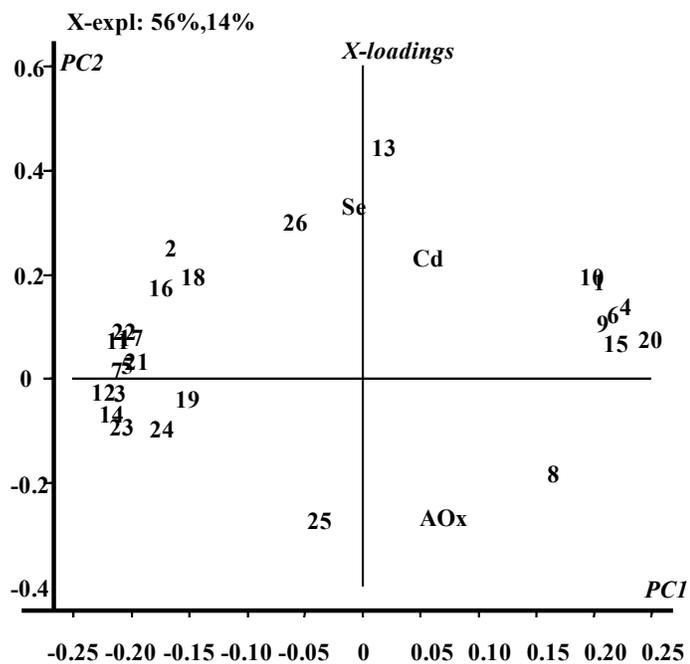
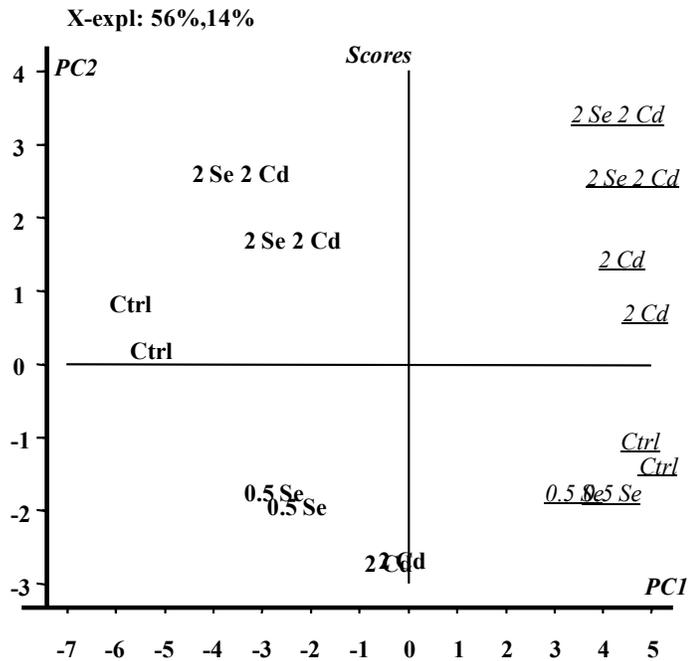


Figura 13 El modelo PCA obtenido para las variables correspondientes a dos fracciones de compuestos fenólicos en *L. sativum*: letras en negritas – compuestos libres y letras subrayadas – solubles enlazados a glicósidos: (a) estructura de los datos en las coordenadas de dos primeros componentes principales (scores), (b) distribución de variables en las mismas coordenadas (X-loadings).

Por su parte, la gráfica de “X-loadings”, o variables en la Figura 13b, indica una serie de relaciones; en primer lugar, la capacidad antioxidante parece ser inversamente relacionada con los niveles de Se(IV) y Cd(II) en el medio. Así que, altos niveles de concentración de cada uno de los estresantes o sus mezclas se asocian con el decremento de la capacidad antioxidante, lo que sugiere daño oxidativo; sin embargo bajas concentraciones podrían estimular un aumento de la capacidad antioxidante, como se observó en el ensayo ABTS para 0.5 mg L^{-1} Se(IV). Otro resultado interesante es la agrupación de Cd y Se con los ácidos dihidroxibenzoicos libres (productos de la oxidación del ácido salicílico por radicales libres OH), frecuentemente detectados como respuesta de plantas al estrés oxidativo.

Se observa además la asociación directa del ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10) con la fracción de fenólicos libres enlazados en forma de glicósidos en plantas expuestas a 2 mg L^{-1} Cd(II) y 2 mg L^{-1} Cd(II) + 2 mg L^{-1} Se(IV) así como su relación inversa con los fenólicos presentes en fracción libre en las plantas control (los ácidos quínico (19), ferúlico (23), salicílico (3), vanílico (12), cafeico (24), cinámico (5), etc.). Estos resultados parecen confirmar que la exposición a relativamente altas concentraciones de iones estresantes provoca la disminución de los fenólicos libres, debido a su oxidación y posterior formación de glicósidos. Cabe mencionar también la asociación directa entre la capacidad antioxidante y el ácido sinápico (25) y siringaldehído (8), dos compuestos que aparentemente contribuyen de manera importante en las propiedades antioxidantes de *L. sativum*.

Para confirmar los resultados obtenidos por GC-FID, en las fracciones 1 y 2 de los trece cultivos de *L. sativum* se llevó a cabo la determinación de los compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos, utilizando el procedimiento reportado anteriormente y descrito en detalle en la parte experimental [93]. El uso de dos sistemas de detección conectadas en serie (DAD y FLD), permitió la cuantificación de los siguientes compuestos: ácido clorogénico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido cafeico, ácido vanílico, *p*-coumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *trans*-2-hidroxicinámico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido salicílico y ácido *o*-anísico (como IS). En la Figura 14a y 15a se presenta el cromatograma de una mezcla de estándares en concentración 20 mg L^{-1} cada uno, donde la Figura 14a corresponde a la detección espectrofotométrica con detector de arreglo de diodos (longitudes de onda analítica 254 nm, 280 nm y 310 nm), mientras que la Figura 15a presenta la detección fluorimétrica del mismo cromatograma (excitación en 305 nm y longitudes de onda de emisión 365 nm, 407 nm y 436 nm). A manera de ejemplo en las Figuras 14b y 14c se

presentan los cromatogramas HPLC-DAD de las fracciones 1 (fenólicos libres) extraídos de la planta control y expuesta a 2 mg L^{-1} Cd(II), respectivamente. En las Figuras 15b y 15c se presentan los mismos cromatogramas, registrados con la detección espectrofluorimétrica. De manera general, en estas figuras se observa una disminución de los niveles de concentración de compuestos fenólicos libres respecto a la planta control, de acuerdo con los resultados obtenidos por GC-FID (Figura. 9, 12). Las diferencias entre niveles de concentración de compuestos individuales determinados por cromatografía de gases respecto el procedimiento por cromatografía de líquidos fue en el intervalo de 15% a 25%, lo que se consideró una concordancia aceptable.

En la primera parte del trabajo, se evaluó la actividad antioxidante en los extractos de las plantas cultivadas bajo diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV) (Tabla 4, Figura 12). Es bien sabido que los ensayos espectrofotométricos presentan varias desventajas, sobre todo en términos de su baja selectividad, para evaluar la actividad antioxidante [102]. En el presente trabajo se eligió el ensayo ABTS, en el que radical libre es generado *in situ* mediante la reacción con ion persulfato. La utilidad de este ensayo ha sido demostrada en el análisis de mezclas de compuestos fenólicos en extractos de plantas, diferentes tipos de bebidas y en fluidos biológicos [107-110]. Por otro lado, se evaluó también la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos individuales con el fin de elucidar su relación con la estructura de compuesto [107, 110-112]. Cabe mencionar las ventajas del ensayo ABTS para este tipo de análisis: la posición de la banda de absorción en la región visible (máximo de absorción del radical libre 734 nm), buena solubilidad del radical en medios acuosos y orgánicos y su estabilidad en un amplio rango de pH. Con los antecedentes que se acaban de mencionar, parecía interesante evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *L. sativum*, con base en las actividades de los compuestos individuales y la concentración de cada uno de ellos encontrada en el extracto por HPLC.

La actividad antioxidante de los compuestos individuales se determinó utilizando las soluciones de los ácidos clorogénico, 2,5-dihidroxibenzoico, cafeico, vanílico, 2,3-dihidroxibenzoico, *p*-coumárico, sinápico, ferúlico, *trans*-2-hidroxicinámico en concentración 50 nM y los ácido *p*-hidroxibenzoico, benzoico, salicílico y coumarico en concentración de 0.5 mM. Para el ensayo se tomaron 40 μL de cada una de las soluciones y se evaluó la actividad antioxidante con base en la curva de calibración obtenida para el ácido gálico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5, donde se observan claramente las diferencias entre las

actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos individuales, expresados como la relación molar entre calibrador y el compuesto de interés (K).

Así, entre los trece compuestos considerados, la mayor actividad antioxidante fue encontrada para los ácidos *p*-coumárico y sinápico ($K > 0.9$), confirmando los resultados reportados por otros autores[111] y también los resultados del primer análisis PCA realizado en este estudio (Figura 13). Por su parte, los ácidos ferúlico, 2,3-dihidroxibenzoico, vanílico y *trans*-2-hidroxicinámico presentaron la actividad con factor K entre 0.54 y 0.66, mientras que el resto de ácidos presentaron la actividad con el factor $K < 0.44$.

A continuación, se calculó la capacidad antioxidante de las fracciones 1 (fenólicos libres) y 2 (fenólicos solubles, enlazados a glicósidos), utilizando la siguiente fórmula:

$$(1) \quad \text{AOX} = \sum_{i=1}^{i=10} (K_i \cdot c_i)$$

donde c_i es la concentración del compuesto fenólico i determinado por HPLC en la fracción 1 o 2 (nmol mg^{-1} de muestra liofilizada) y el valor AOX tiene la dimensión física de nmoles del ácido gálico por un mg de muestra liofilizada.

Los resultados obtenidos en las fracciones 1 y 2 de los cultivos de *L. sativum* expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II) y de Se(IV) se presentan en la Figura 16a y 16b respectivamente. Cabe señalar que estos resultados difieren de aquellos presentados en la Figura 12, puesto que en la primera parte de trabajo el ensayo ABTS se llevó a cabo en los extractos metanólicos de la planta (fenólicos solubles totales, sin fraccionamiento). En la Figura 16a se puede observar que la presencia de Cd(II) en niveles de concentración $< 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ influye en el aumento de la actividad antioxidante conferida por los compuestos fenólicos enlazados en forma de glicósidos; para concentraciones mayores del ión estresor, la actividad antioxidante relacionada con estos compuestos tiende a mantenerse elevada respecto al valor basal (planta control).

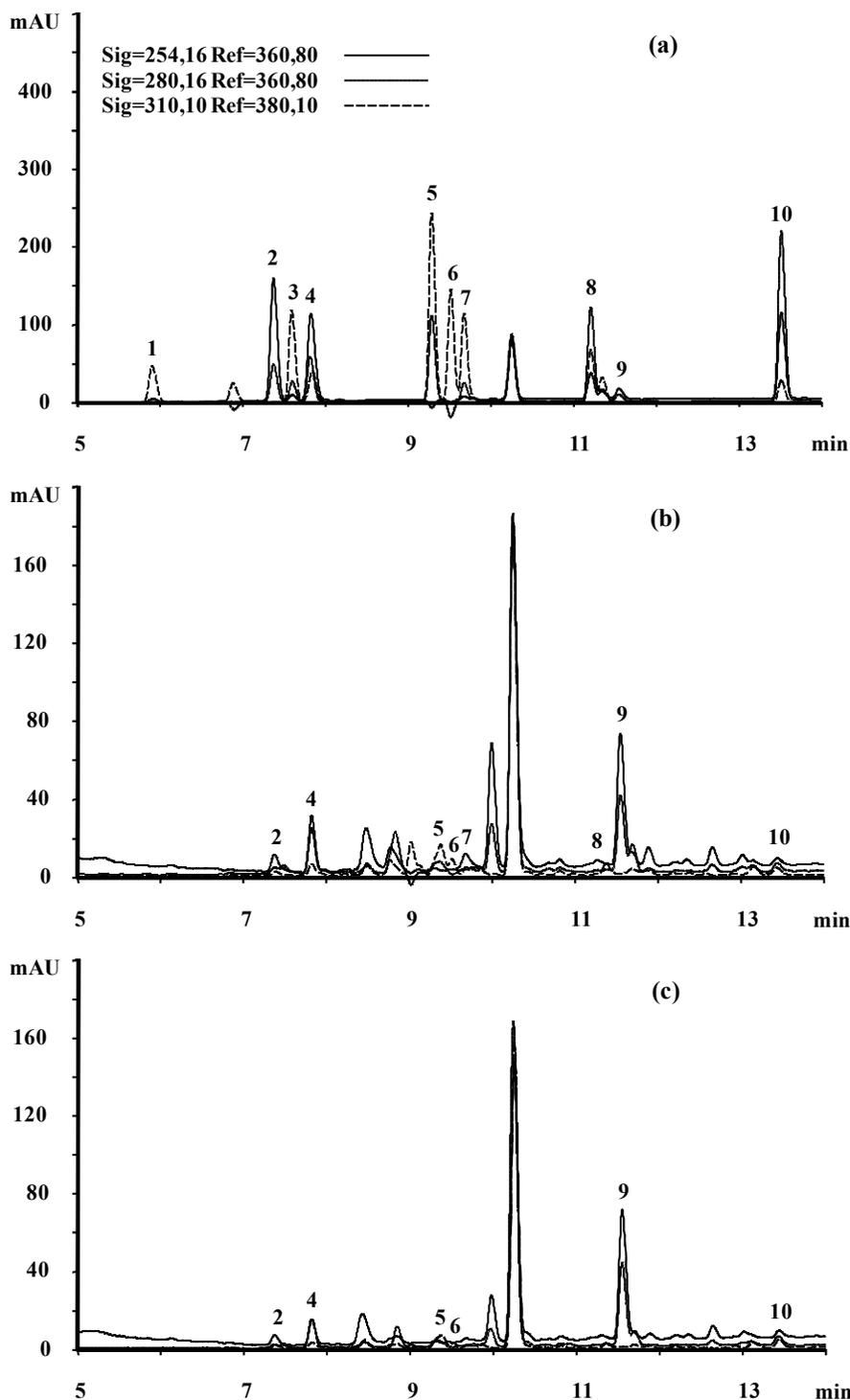


Figura 14 Cromatogramas HPLC-DAD: (a) mezcla de estándares; (b) fracción 1 de *L. sativum* control (c) fracción 1 de la planta expuesta a 2 mg L⁻¹ Cd(II) **1** ác. clorogénico, **2** ác. 4-hidroxicinámico, **3** ác. cafeico, **4** ác. vanílico, **5** ác. *p*-coumárico, **6** ác. sináptico, **7** ác. ferúlico, **8** ác. *trans*-2-hidroxicinámico, **9** ác. benzoico, **10** ác. cinámico

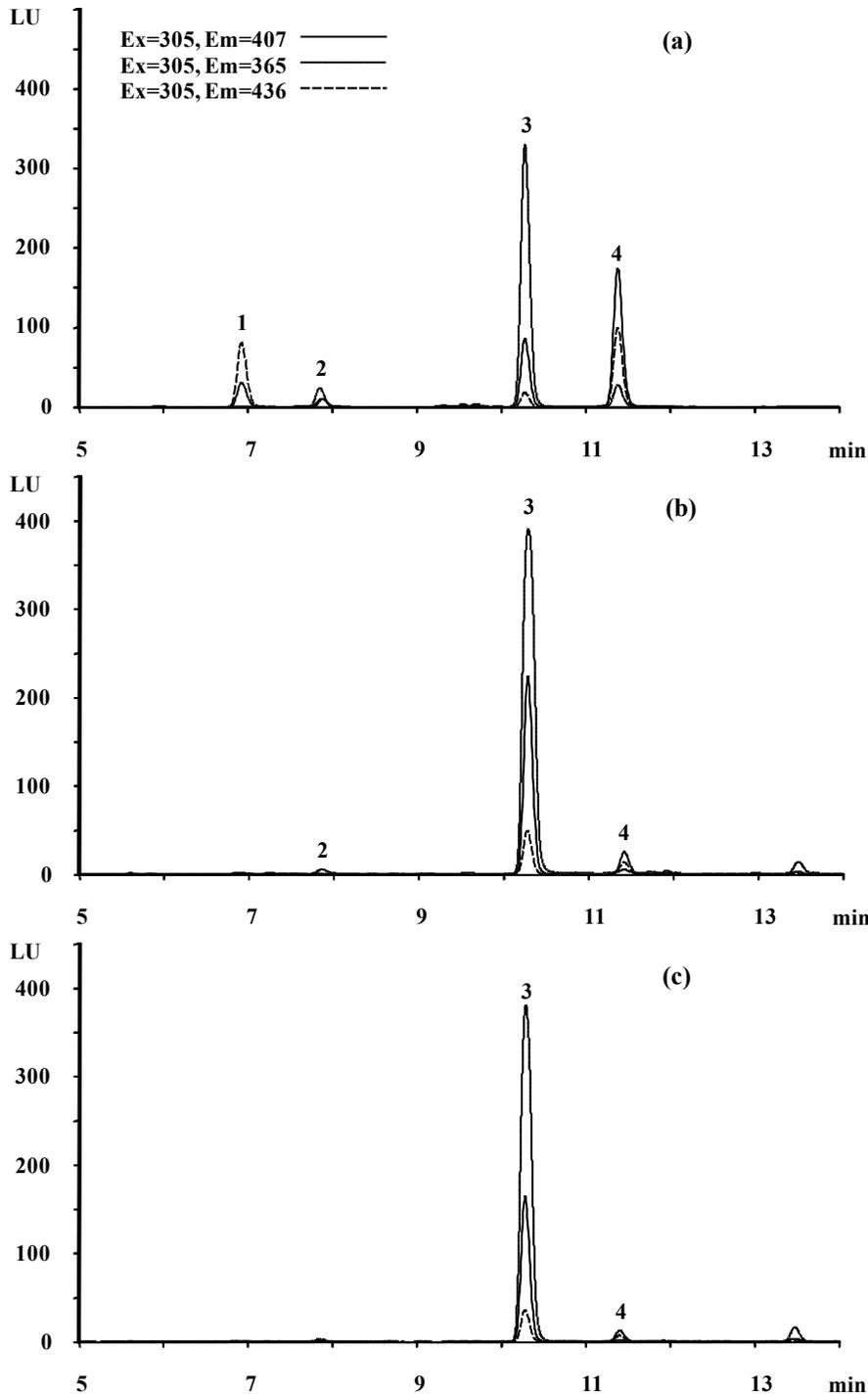


Figura 15 Cromatogramas HPLC-FLD: (a) mezcla de estándares; (b) fracción 1 de *L. sativum* control (c) fracción 1 de la planta expuesta a 2 mg L^{-1} Cd(II) **1** ác. 2,5-dihidroxibenzoico, **2** ác. 2,3-dihidroxibenzoico, **3** ác. o-anísico (IS), **4** ác. salicílico.

Tabla 5 Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos individuales (ensayo ABTS, detalles en la parte experimental).

Compuesto (CF)	n _{CF}	n _{AG}	K= n _{AG} /n _{CF}
Á. chlorogénico	2.00	0.73	0.36
Á. 2,5-dihidroxibenzoico	2.00	0.58	0.29
Á. p-hidroxibenzoico	20.0	2.80	0.14
Á. cafeico	2.00	0.72	0.36
Á. vanílico	2.00	1.08	0.54
Á. 2,3-dihidroxibenzoico	2.00	1.31	0.66
Á. p-coumárico	2.00	1.84	0.92
A. sinápico	2.00	1.85	0.92
A. ferúlico	2.00	1.32	0.66
Á. trans-2-hidroxicinámico	2.00	0.89	0.44
Á. salicílico	20.00	N.D.	—
Á. benzoico	20.00	N.D.	—
Á. cinámico	20.00	N.D.	—

n_{CF}- nmoles del compuesto fenólico utilizado en el ensayo ABTS

n_{AG}- nmoles del ácido gálico equivalentes a la cantidad del CF

N.D.- No detectado

Por otro lado, bajas concentraciones de cadmio están relacionadas con la disminución de la actividad antioxidante en la fracción de fenólicos libres, el efecto que desaparece con aumento de la concentración de Cd(II). El efecto de Cd(II) en fenólicos solubles totales (fracción 1 + 2) en la figura Figura 16a es muy similar respecto a los resultados presentados en la Figura 12a, confirmando de esta manera que el ion cadmio incide en el aumento de la actividad antioxidante de la planta, pero su efecto en fenólicos libres y enlazados es aparentemente diferente, de acuerdo con lo presentado en la Figura 9. En el caso de selenio, sus efectos difieren de los observados en presencia de Cd(II); como se puede observar en la Figura 16b, la actividad antioxidante relacionada con los fenólicos libres (fracción 1) aumenta con el incremento de la concentración de Se(IV) en el medio, pero para concentraciones mayores de 1.5 mg L⁻¹ este efecto tiende a desaparecer. En la fracción 2 (fenólicos solubles unidos a glicósidos), la influencia de Se(IV) en la actividad antioxidante es mucho menos marcada. El perfil de cambios en la actividad antioxidante de fenólicos solubles totales en presencia de diferentes concentraciones de Se(IV) (fracción 1 + 2, Figura 16b) es un poco diferente del perfil obtenido cuando el ensayo ABTS se llevó a cabo en el extractos metanólicos de plantas (Figura 12b); sin embargo en ambos casos después de un incremento de la actividad antioxidante en bajas concentraciones de Se(IV), dicha

actividad tiende a disminuir a partir de la concentración de Se(IV) de 1.5 mg L⁻¹. Las diferencias entre los resultados presentados en las Figuras 12b y 16b deben de adscribirse al diferente ambiente químico en la aplicación del ensayo ABTS; en la primera parte de trabajo la determinación se llevó a cabo en el extracto de la planta, una matriz química compleja que no aseguraba la selectividad del ensayo hacia los compuestos fenólicos de interés (Figura 12). Por su parte, en la Figura 16 se presentan los resultados con base en la cuantificación de los compuestos individuales por HPLC y los resultados de ensayo ABTS para los compuestos individuales, lo que asegura mayor selectividad.

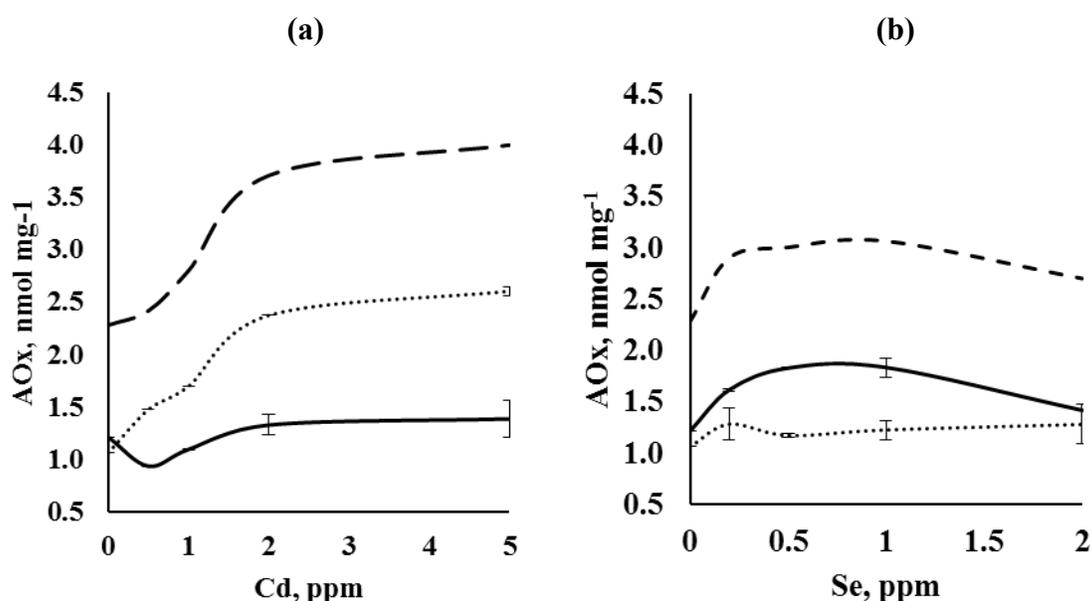


Figura 16 Actividad antioxidante evaluada con base en las contribuciones de los compuestos individuales, en las fracciones 1 (fenólicos libres, —) y 2 (fenólicos solubles unidos a glicósidos, ····) de *L. sativum*, cultivados en presencia de: (a) Cd(II) y (b) Se(IV). A manera de suma global se presenta el efecto de ambas fracciones (----).

Para observar el efecto de los dos iones estresantes adicionados al medio de crecimiento de manera individual y como mezclas de los dos, los resultados de la actividad antioxidante evaluados en la fracción 1, fracción 2 y suma de dos fracciones se presentan en la Figura 17. En primer lugar hay que resaltar que, en la exposición simultánea a los dos iones estresantes siempre existe una región de concentraciones donde se observa la atenuación de los efectos observados para cada uno de los iones individuales; esta zona “plana” de la actividad antioxidante se ha

encontrado en la fracción 1 (Figura 17a), fracción 2 (Figura 17b) y en la suma de estas dos fracciones (fenólicos solubles totales, Figura 17c), lo que parece confirmar el efecto protector de Se(IV) contra la fitotoxicidad de Cd(II) observada anteriormente en la misma planta [92].

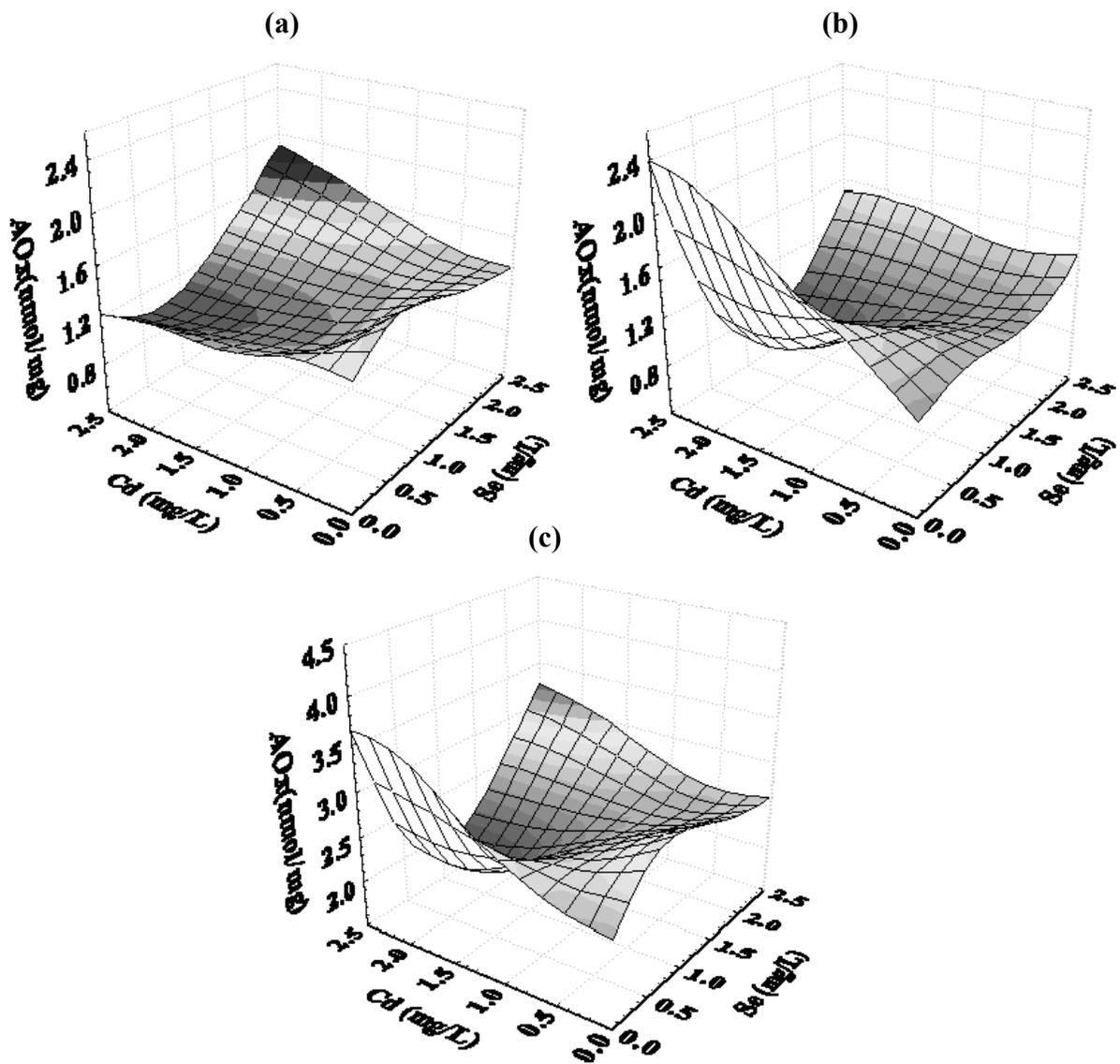


Figura 17 Perfiles de actividad antioxidante para trece cultivos de *L. sativum* expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II), Se(IV) o ambos iones, evaluados para (a) - fenólicos libres (fracción 1), (b) - fenólicos solubles unidos a glicósidos (fracción 2) y (c) – fenólicos solubles totales (fracción 1 + 2).

Por su parte, en las figuras 17a y 17b se observa de nuevo, que la exposición a Cd(II) y Se(IV) afecta de manera más importante la fracción de compuestos fenólicos solubles enlazados, siendo el ión Cd(II) de mayor influencia. Es de notar también que, en todas las condiciones de exposición exploradas, la actividad antioxidante fue mayor respecto a las plantas control y que altas concentraciones de ambos iones ($> 2 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd(II) y de Se(IV)) causaron un aumento de la actividad antioxidante en ambas fracciones. Finalmente, se puede observar que la superficie de respuesta obtenida para la suma de fracciones 1 + 2 (Figura 17c) es muy parecida a aquella presentada en la Figura 12c.

La concordancia entre los resultados obtenidos con base en el ensayo ABTS llevado a cabo en el extracto de fenólicos solubles totales (Figura 12) y los evaluados con base en la fórmula 1 y Figura 17c, indica que diez de los trece compuestos seleccionados para el cálculo de la actividad antioxidante (Tabla 5) en las fracciones 1, 2 y 1+2, son los que contribuyen de manera importante en esta propiedad de los extractos. Es por ello que se decidió repetir el análisis multivariante de los componentes principales (PCA), reduciendo en esta ocasión el número de variables para incluir las concentraciones solamente de estos diez compuestos representativos. El modelo PCA obtenido con base en dos primeros componentes principales describe 75 % de la variabilidad total del sistema y se presenta en la Figura 18. La gráfica de scores (Figura 18a) presenta la distribución de los datos de manera similar que el modelo anterior (Figura 13a), es decir se observa la separación de los datos correspondientes a la fracción 1 (letras en negrita en la gráfica) de los de la fracción 2 (letras subrayadas); y también existe la distribución de las muestras, de acuerdo con las condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV).

Por su parte en la gráfica de “X-loadings”, o variables, en la Figura 18b la capacidad antioxidante está directamente relacionada con la exposición a Cd(II) e inversamente relacionada con la exposición a Se(IV). Estos resultados están de acuerdo con la Tabla 4, y las figuras 12, 16 y 17 e indican que el ión Cd(II) induce el incremento de la capacidad antioxidante en todo el intervalo de concentraciones estudiadas, mientras que Se(IV) presenta este efecto solamente cuando se presenta en las concentraciones $< 1.5 \text{ mg L}^{-1}$. Parece importante que el modelo PCA revela la relación inversa entre Cd(II) y Se(IV), en concordancia con el efecto atenuador del selenio observado en la exposición simultánea de *L. sativum* a los dos iones estresantes (Figura 12c y 16). Este resultado aporta una evidencia adicional del efecto protector del selenio contra la toxicidad de cadmio en esta especie vegetal [92]. En cuanto a los compuestos fenólicos solubles que confieren la capacidad antioxidante a la planta, se puede observar la agrupación de dicha

variable con el ácido sinápico, ferúlico y 2,3-dihidroxibenzoico, de acuerdo con los datos presentados en la Tabla 5 y con los resultados del primer análisis PCA (utilizando mayor número de variables).

La comparación de las gráficas de scores y X-loadings (Figura 18a y 18b) sugiere que, algunos de los compuestos tienen mayor contribución en la fracción 1 de fenólicos libres (ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico), mientras que otros tienden a formar enlaces con glicósidos (ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido trans-2-hidroxicinámico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico y el ácido 4-hidroxibenzoico). Otro resultado, también en concordancia con el primer modelo PCA, es la asociación directa del ácido 2,3-dihidroxibenzoico con la fracción de fenólicos enlazados en forma de glicósidos en plantas expuestas a altas concentraciones de Cd(II) y Cd(II) Se(IV) y la separación de estas muestras de los fenólicos libres, lo que parece reafirmar que la exposición a relativamente altas concentraciones de iones estresantes provoca la disminución de los fenólicos libres, debido a su oxidación y posterior formación de glicósidos. En este contexto cabe señalar que los derivados del ácido cinámico (ácidos *p*-coumarico, ferúlico, sinápico), son intermediarios en la síntesis de ligninos [113, 114]; además algunos de los ácidos fenólicos (ferúlico) juegan un papel importante en la cohesión de los polímeros de ligninos y polisacáridos en la integración de pared celular[115], por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan al fortalecimiento de la pared celular mediante incorporación de fenólicos, como uno de los mecanismos defensivos de *L. sativum* en condiciones de estrés abiótico.

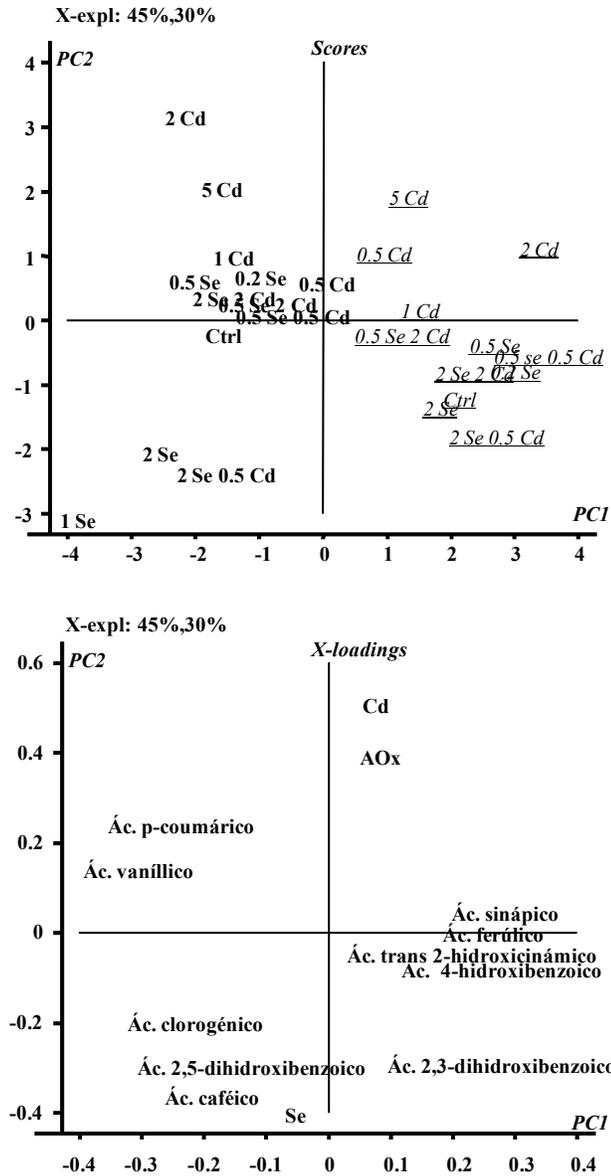


Figura 18 El modelo PCA obtenido con base en las concentraciones de los ácidos clorogénico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, vanílico, *p*-coumárico, sinápico, ferúlico, *trans*-2-hidroxicinámico, 2,5-dihidroxi benzoico y 2,3-dihidroxi benzoico, determinados en las fracciones 1 y 2 de *L. sativum*: crecido en diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV): letras en negritas – fracción 1 de compuestos libres y letras subrayadas – fracción 2 de fenólicos solubles enlazados a glicósidos: (a) estructura de los datos en las coordenadas de dos primeros componentes principales (scores plot), (b) distribución de variables en las mismas coordenadas (X-loadings plot).

IV.2.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del procedimiento GC-FID desarrollado en la primera parte de trabajo en el análisis de extractos de plantas. Para evaluar la exactitud de los resultados, se empleó el procedimiento por cromatografía de líquidos en fase inversa establecido anteriormente [93], obteniéndose para diez compuestos el error relativo no mayor de 25 %, lo que fue considerado una concordancia aceptable y una evidencia clara de la confiabilidad del procedimiento GC-FID.

El análisis de trece cultivos de *L. sativum*, obtenidos en diferentes condiciones de exposición a Cd(II) y Se(IV) aportó nuevas evidencias sobre el impacto del estrés abiótico impuesto por estresantes individuales y sus mezclas en esta especie de planta. En particular, se observó diferente perfil de los compuestos fenólicos en plantas control respecto a las expuestas, efecto que fue más notorio para el Cd(II) respecto a Se(IV) y a las mezclas de los dos iones, especialmente en las fracciones de fenólicos libres y solubles unidos a glicósidos.

Puesto que los compuestos fenólicos confieren a las plantas la actividad antioxidante, se buscó la relación entre los tres siguientes parámetros: (1) condiciones de exposición; (2) perfil de los compuestos fenólicos solubles (libres y enlazados con glicósidos) y (3) actividad antioxidante. En las plantas expuestas, la capacidad antioxidante de la fracción de fenólicos solubles totales fue siempre elevada respecto a las plantas control; sin embargo la respuesta de planta dependía de las condiciones de la exposición y también fue diferente para fenólicos libres y fenólicos solubles unidos a glicósidos. Así, la presencia de Cd(II) fue asociada con el decremento de los compuestos fenólicos libres e incremento de los enlazados a glicósidos, además su presencia se relacionó con el aumento de la actividad antioxidante de fenólicos unidos a glicósidos en todo el intervalo de las concentraciones estudiadas. Estos resultados aunados a los resultados del análisis PCA aluden a que el cadmio, al imponer estrés oxidativo, activa la respuesta de la planta en términos de la incorporación de fenólicos libres en precursores de los ligninos para fortalecimiento de la pared celular y en términos del daño oxidativo directo cómo lo indicó la asociación de Cd(II) con el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, producto de oxidación del ácido salicílico por radicales libres.

En el caso del selenio, los cambios de los niveles de compuestos fenólicos fueron menos notorios respecto al cadmio; siendo la más afectada la fracción de fenólicos libres. En el ensayo ABTS se observó un incremento de la actividad antioxidante de esta fracción 1 para las concentraciones $< 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ Se(IV). Los resultados obtenidos parecen indicar que el selenio en bajas concentraciones podría inducir la formación de compuestos fenólicos libres, efecto muy diferente respecto al observado para el cadmio.

En la exposición simultánea a los dos iones estresantes ($< 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada uno), se encontró la atenuación los efectos observados para cada uno de los iones individuales; lo que parece confirmar el efecto protector de Se(IV) contra la fitotoxicidad de Cd(II) observada anteriormente en la misma planta [92].

IV.3. MONITOREO DE IÓN ÓXIDO DE FÓSFORO PARA LA ESPECIACIÓN ANALÍTICA DE FOSFITO Y FOSFATO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS POR HPLC-ICP-MS

IV.3.1. Introducción

A causa de que existe una gran variedad de las especies de fósforo presentes en los tejidos de plantas, tanto orgánico como inorgánico, y debido a la compleja matriz química de las mismas es necesario establecer criterios o puntos que permitan realizar un análisis de especiación adecuado es decir, llevar a cabo la extracción selectiva de los compuestos, contar con una buena sensibilidad en el método de análisis y que la cuantificación de fósforo se encuentre libre de interferencias para cada una de las fracciones obtenidas. En estudios previos, la extracción de estos compuestos fue realizada con el uso de agua, ácido fórmico o acético diluido, mezclas de agua y metanol, con temperaturas que pueden ser en ambiente o mayor, finalmente hay casos en los que se aplica una prolongada agitación (mayor a 3 horas). Los extractos obtenidos usualmente son purificados mediante extracción en fase sólida, con la finalidad de eliminar compuestos orgánicos y especies iónicas co-extraídas con las especies de fósforo; sin embargo la evaluación del rendimiento de la extracción de cada especie de fósforo raramente se ha llevado a cabo [67, 69, 70, 116-118].

La cromatografía de líquidos con detectores conductimétricos ha sido la técnica predominante en la aplicación del análisis de los oxianiones de fósforo en extractos de plantas, permitiendo límites de detección del orden de partes por millón [68, 69]. Vale la pena mencionar que la cromatografía de intercambio iónico, aplicando un gradiente para la elución de los analitos, empleando elevado pH y con detección conductimétrica con supresión de la conductividad de la fase móvil, como la aplicada a muestras de agua, proporcionó más bajos valores de los límites de detección, del orden de sub- partes por billón; sin embargo, en muestras más complejas ha sido difícil alcanzar estos valores, debido a la baja selectividad haciendo que sea una limitación importante [119, 120]. Alternativamente, la derivatización precolumna con diazometano o *N*-metil-*tert*-butildimetilsilil-trifluoroacetamida fue propuesta para su análisis mediante GC-FID, en donde se tuvieron límites de detección de bajas partes por millón en el análisis de plantas [69, 121]. La aplicación de trampas iónicas con detección espectrométrica de masas permitió una mejora en el poder de detección (0.1 ng en columna) [69]. Se desarrollaron ensayos fluorimétricos específicos a fosfito, en donde se alcanzaron límites de detección de 5

$\mu\text{mol L}^{-1}$ (alrededor de 0.4 mg L^{-1}), estos ensayos están basados en la oxidación enzimática a fosfato en presencia de resazurina y la subsecuente medición fluorimétrica de la forma reducida de este reactivo [67]. La combinación de técnicas de espectrometría atómica con cromatografía de líquidos ya ha sido aplicada en el análisis de especiación de fósforo en herbicidas [122], extractos de suelos [123] y en diferentes muestras de aguas naturales [120, 124, 125], sin embargo en estudios recientes se han realizado aproximaciones en el análisis de estos compuestos en plantas [64].

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente es considerada como técnica predilecta en el análisis de elementos traza para estudios de especiación, sin embargo su aplicación para fósforo monoisotópico está comprometida, a causa de que el primer potencial de ionización de este elemento es alto, así como por las interferencias poliatómicas que se llegan a presentar; estas se deben a la formación de iones poliatómicos que contienen principalmente átomos de nitrógeno, oxígeno y carbono [126]. Se han propuesto muchas estrategias para mejorar la determinación de P por ICP-MS, las cuales se basan en la eliminación de la matriz orgánica, disminución en la cantidad de muestra suministrada al plasma, el uso de instrumentos de alta resolución o la aplicación de celdas de colisiones/reacciones. En particular, fue demostrado que las celdas presurizadas con helio son capaces de minimizar o detener la introducción de iones poliatómicos al filtro de masas, mediante la discriminación de estos iones en función de su energía cinética [122, 123, 127]; se han desarrollado sistemas en donde el oxígeno puede ser introducido a celdas de reacción dinámicas, haciendo que se promueva la formación del ión oxido de fósforo con m/z 47, con mucho menor número de probables interferencias poliatómicas respecto a los que se presentan para m/z 31 [128-130]. Existen estudios que se basan en la generación del ión oxido de fósforo en los que han sido optimizadas las condiciones de operación del plasma [131], con este mismo objetivo se han hecho análisis de soluciones de fósforo que contienen ácido nítrico o metanol [132]. Es necesario señalar que no es posible una mejora en la sensibilidad por el uso de la celda de reacciones dinámicas, por lo que la ausencia de este aditamento resulta de interés debido a su potencial aplicabilidad en los más austeros instrumentos ICP-MS.

IV.3.2. Objetivo

Desarrollar un nuevo procedimiento de especiación analítica de iones fosfito y ortofosfato basado en la separación por cromatografía de líquidos y detección específica de fósforo por ICP-MS para su aplicación en el análisis de plantas.

IV.3.3. Parte experimental

Muestras biológicas

Tres plantas de tabaco transgénicas crecidas en presencia de P(III) como única fuente de fósforo (muestras 1, 2, 3) y una mezcla de muestras, fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Luis Herrera-Estrella del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, México. El material fue recibido como biomasa homogenizada y liofilizada.

Metodología

El ICP-MS fue usado con un nebulizador MiraMist Teflon®. Una cámara de enfriamiento Peltier la cual fue operada a 2 °C. El procedimiento de ajuste estándar (tuning) se llevó a cabo usando una solución de Li, Y, Tl, Ce ($1\mu\text{g L}^{-1}$ de cada elemento) y posteriormente se ajustaron los parámetros para la detección de m/z 47 usando una solución de P(V) disuelto con la fase móvil ($10\mu\text{gP L}^{-1}$). Para la detección de fósforo con m/z 31, el octopolo de la celda de colisiones/reacciones fue usado con un flujo de He de 3.5 mL min^{-1} [127].

Para la extracción de iones ortofosfato y fosfito, a 40-50 mg de material de planta liofilizado se le adicionó 1.0 mL de EDTA 10 mmol L^{-1} (pH 8.0) y la mezcla fue colocada en un baño ultrasónico durante 30 min a temperatura ambiente. Después la muestra fue centrifugada a $10\,000\text{ xg}$ durante 10 min, el sobrenadante fue colectado y el procedimiento de limpieza se realizó con tubos Supelclean LC-18 SPE. Los tubos de limpieza fueron acondicionados con 2 mL de metanol, para evitar la posible presencia de las especies de fósforo los tubos SPE se lavaron con 2 mL de la solución usada para la extracción (EDTA 10 mmol L^{-1} , pH 8), finalmente se colocó 1 mL del extracto de plantas y se hizo pasar a través del tubo a una velocidad aproximada de 1 mL min^{-1} . Finalmente, para remover partículas que pudiesen cerrar los canales por donde

pasa la muestra en HPLC-ICP-MS, el extracto filtrado se limpió con un filtro IC Acrodisc (0.2 μm) y después de una apropiada dilución con la fase móvil (máximo 20 veces), 100 μL de la solución fueron inyectados al sistema cromatográfico con detección por ICP-MS.

La separación se realizó aplicando elución isocrática utilizando como fase móvil ftalato de hidrógeno y potasio 5 mmol L^{-1} (ajustado a pH 2.5 con ácido nítrico) con un flujo de 1.0 mL min^{-1} y a temperatura ambiente. Las condiciones de operación del ICP-MS establecidas para la detección de la señal m/z 31 y m/z 47, se presentan en la Tabla 6. La cuantificación se realizó utilizando calibración externa a partir de una mezcla de P(III) + P(V), las soluciones estándar se prepararon a cinco niveles de concentración (0, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo como P(III) y como P(V), respectivamente); finalmente para el método de cuantificación se utilizó el área de pico cromatográfico. Se llevó a cabo el análisis mediante estadística descriptiva para obtener medias y desviaciones estándar.

IV.3.4. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo fue establecer un procedimiento de especiación para P(III)/P(V), en el cual la adición de ácido nítrico permitió una adecuada detección de fósforo a m/z 47 por ICP-MS sin el uso de la celda colisiones/reacciones. En experimentos iniciales, la separación se llevó a cabo en una columna de intercambio aniónico(SAX) con ftalato de potasio 10 mmol L^{-1} (pH 4.0); sin embargo los picos cromatográfico resultaron poco simétricos, la señal de fondo en el ICP-MS (> 1600 cps) y la sensibilidad para m/z 47 fue pobre [5]. Para mejorar el estudio analítico, se propuso el uso de una columna polimérica, con fase móvil más diluida con adición de ácido nítrico y comparar los resultados obtenidos de la detección elemental contra los del ión óxido de fósforo.

El efecto del ácido nítrico en la determinación de fósforo a m/z 31 y m/z 47 por ICP-MS ya había sido reportado anteriormente [132]. El objetivo principal del estudio citado fue evaluar el potencial impacto del ácido nítrico presente en la muestra como residuo de la digestión de materiales orgánicos; por lo tanto, se utilizaron relativamente altas concentraciones de este ácido (superiores a 2.5 mol L^{-1}) y se obtuvieron límites de detección deteriorados para los dos iones monitoreados; sin embargo para bajas concentraciones de ácido (< 0.1 mol L^{-1}), la señal de ruido de fondo se incrementó a m/z 47, mientras a m/z 31 el deterioro de la señal menos pronunciado

respecto las concentraciones más altas [132]. Con base en este trabajo y también tomando en cuenta que el ácido nítrico debe estar presente en baja concentración en la fase móvil, en el presente trabajo se examinó el efecto del ácido nítrico sobre la señal de m/z 47 en el rango de concentraciones 0 – 10 mmol L⁻¹. Para esta etapa, se preparó una solución del blanco (5 mmol L⁻¹ de ftalato o agua desionizada) y una solución estándar de fosfato usando como disolvente la fase móvil, en ambas soluciones se evaluaron diferentes concentraciones de ácido nítrico por medio de su introducción directa al plasma. Los resultados son presentados en la Figura 19, hay que señalar que se han aplicado las condiciones de ajuste finales en este experimento para una mejor claridad de la presentación (Tabla 6).

Tabla 6 Condiciones de operación de ICP-MS.

Detección por ICP-MS	<i>m/z</i> 31	<i>m/z</i> 47
Potencia del plasma	1500 W	
Flujo de gas nebulizador	0.9 L min ⁻¹	0.85 L min ⁻¹
Gas Make-up	0.1 L min ⁻¹	0.4 L min ⁻¹
Nebulizador	MiraMist Teflon®	
Cámara de rociado	Peltier cooled chamber, 2 °C	
Conos de muestra y skimmer	Platinum	
Profundidad de antorcha	9 mm	8.5 mm
Lentes de extracción de iones 1	2.5 V	-180 V
Lentes de extracción de iones 2	-130V	-60V
Entrada de celda	-30 V	-36 V
QP focus	-15 V	-3 V
Salida de celda	-50 V	-60 V
OctP RF	100 V	
OctP Bias	-18 V	-12 V
Modo de adquisición	Time resolved analysis	
Tiempo de captura	100 ms	
Celda de colisiones/reacciones	3.5 mL min ⁻¹ He	No

Como se puede observar, el incremento en la concentración de ácido nítrico causó un gradual incremento de la señal de fondo para las tres soluciones analizadas. La señal neta evaluada para el estándar de fosfato ($25 \mu\text{gP L}^{-1}$) aumentó de 2517 cps, en ausencia de ácido, a 3260 cps para la concentración de 10 mmol L^{-1} (un incremento del 30%) y aún más importante, la señal se mantuvo relativamente estable en el rango de concentración de ácido nítrico de $4\text{-}8 \text{ mmol L}^{-1}$ ($3092 \pm 73 \text{ cps}$), indicando que este rango puede ser usado sin problemas en la separación cromatográfica con la señal de m/z 47.

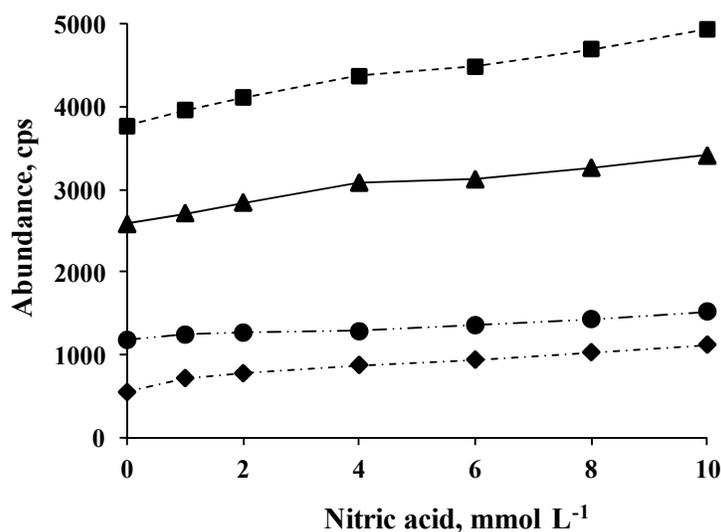


Figura 19 Efecto del ácido nítrico en la señal m/z 47 por ICP-MS: (---♦---) agua desionizada; (---●---) ftalato de potasio 5 mmol L^{-1} ; (---■---) $25 \mu\text{gP L}^{-1}$ de P(V) en ftalato de potasio 10 mmol L^{-1} ; (—▲—) señal de fósforo menos la de ftalato.

La siguiente tarea fue el ajustar apropiadamente las condiciones del equipo para la detección del ion elemental y el óxido del mismo, en presencia de la fase móvil. Para m/z 31, los parámetros de ajuste y las condiciones de la celda de colisiones/reacciones se tomaron de un trabajo previo [127] (Tabla 6). Se preparó una solución estándar de fosfato y un blanco (ftalato 5 mmol L^{-1} conteniendo ácido nítrico 8 mmol L^{-1}), las cuales se introdujeron al equipo para corroborar la posible presencia de interferentes isobáricos o poliatómicos a m/z 47 ($^{47}\text{Ti}^+$, $^{94}\text{Zr}^{2+}$, $^7\text{Li}^{40}\text{Ar}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$), así como el efecto del flujo de He en el rango de $0 - 5 \text{ mL min}^{-1}$. Como se puede observar en la Figura 20, la señal del blanco siempre se encontró por debajo de 830 cps , la señal de la solución estándar de fosfato ($25 \mu\text{gP L}^{-1}$) disminuyó de manera importante con un flujo de gas He mayor a 0.5 mL min^{-1} y la concentración equivalente de fondo

(BEC) incrementó gradualmente, los resultados que en su conjunto indicaron que no es necesario el uso de la celda de colisiones/reacciones para m/z 47. Las condiciones de operación del plasma y los voltajes de QP focus, salida de celda y OcP bias fueron ajustados variando un parámetro a la vez tomando como criterio de ajuste la mayor sensibilidad (señal neta para $10 \mu\text{gP L}^{-1}$ como fosfato, mediante su introducción directa al ICP-MS). En este aspecto, la potencia del plasma se mantuvo a 1500 W, los voltajes de octopolo RF a 100 V para ambos valores de m/z . Un corto tiempo de residencia en el plasma favorece la formación de óxidos, por lo cual el flujo del gas make-up y la profundidad de la antorcha fueron examinados en el rango de $0.1 - 0.8 \text{ mL min}^{-1}$ y 4 - 9 mm, respectivamente; los valores seleccionados para la detección de óxidos fueron de 0.4 mL min^{-1} y 8.5 mm (Tabla 6). Debido a que la celda del octopolo no se presurizó con He para m/z 47, los valores seleccionados para QP focus, salida de la celda y OcP bias fueron diferentes respecto a m/z 31 (Tabla 6).

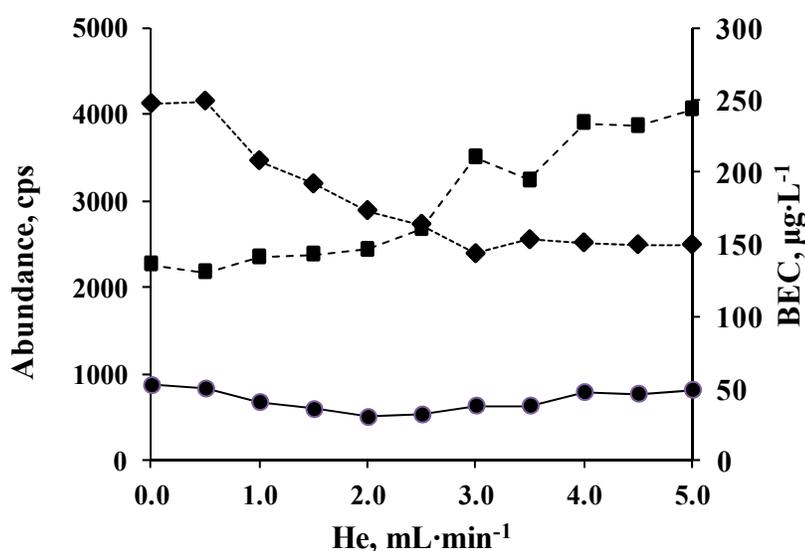
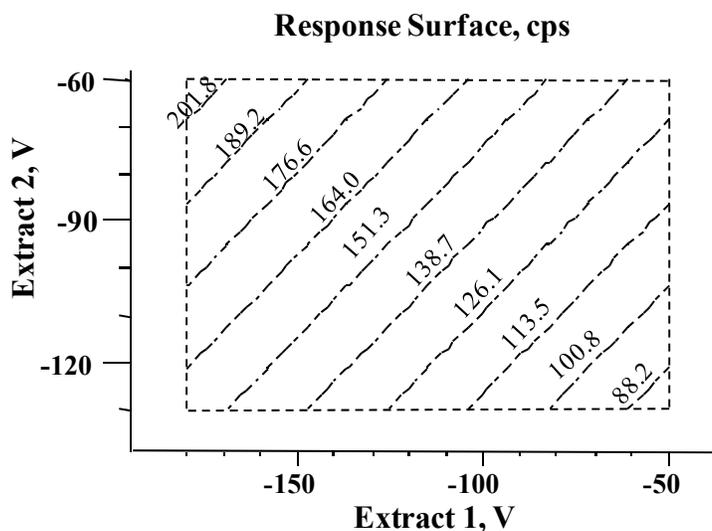


Figura 20 Efecto de la velocidad del flujo de He en la celda del octopolo en la señal m/z 47 por ICP-MS: (---■---) BEC, $\mu\text{gP L}^{-1}$; (···◆···) $25 \mu\text{gP L}^{-1}$ de fosfato en la fase móvil; (—●—) ftalato de potasio en 8 mmol L^{-1} de ácido nítrico.

Finalmente se hizo el ajuste de los voltajes de los lentes que dirigen los iones, la señal neta para $10 \mu\text{gP L}^{-1}$ como P(V) se registró usando tres diferentes valores en la entrada de celda (-44 V, -36 V y -30 V), mientras se variaban otros dos parámetros de acuerdo a lo establecido en un diseño factorial de cuatro niveles. Específicamente, los voltajes probados fueron: -180 V, -150 V, -100 V, -50 V para el lente denominado Extract 1 y con valores de -130 V, -120 V, -90 V, -60 V para el lente Extract 2. La optimización de estos parámetros se llevó a cabo mediante un

análisis estadístico de superficie de respuesta, usando el software The Unscrambler, y los resultados obtenidos revelaron relativamente altas intensidades para la señal de P cuando la entrada de celda presentaba un voltaje de -36 V respecto a -44 V y -30 V. En la Figura 21, la superficie de respuesta para entrada de celda de -36 V es presentado y se puede observar que a voltajes menores en Extract 1 (-180 V) y mayores voltajes en Extract 2 (-60 V) se obtiene la mejor sensibilidad en la detección de fósforo a m/z 47. Los parámetros de todos los ajustes finales se encuentran resumidos en la Tabla 6.



Y-var: signal-blk, (X-var = value): Cell entrance = -36.7V

Figura 21 Superficie de respuesta para la señal neta de $10 \mu\text{gP L}^{-1}$ como P(V) obtenido en con un voltaje en la entrada de celda de -36 V, y diferentes voltajes en los lentes de extracción 1 (180V - -50V) y extracción 2 (-130V - -60V).

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Hamilton PRP-X100 con soporte polimérico químicamente inerte, esperando una mejor simetría en los picos y una línea base más baja en el ICP-MS comparando con lo reportado con columnas basadas en sílica, en las cuales los grupos residuales silanol presentan afinidad a especies iónicas, con lo que potencialmente pueden afectar en la retención y recuperación de los oxianiones de fósforo de la columna. En la cromatografía de intercambio iónico con detección conductimétrica, han sido usadas con regularidad fases móviles alcalinas para la separación de oxianiones de fósforo completamente desprotonados [119, 120], sin embargo elevados valores de pH fueron evitados en este trabajo con la finalidad de proteger los componentes del sistema HPLC-ICP-MS y más importante, para la detección y cuantificación de PO^+ , era necesaria la presencia del ácido nítrico en la fase móvil en el rango de concentraciones $4\text{-}8 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 19). Varios autores

reportaron la separación de oxianiones de P en el rango de pH 2.5 - 4.0 con fases móviles a base de iones orgánicos como ftalatos, succinato, malonato, citrato, etcétera [69, 124, 133, 134]. La carga única de los aniones H_2PO_3^- y H_2PO_4^- , como se presentan estas especies a las condiciones establecidas [135], presentarían baja retención respecto a los aniones doble- o triplemente cargados así como tiempos de análisis menores, especialmente importante cuando un instrumento como el ICP-MS es usado como sistema de detección. Debido a que la técnica no tolera altos valores de pH, se intentó trabajar con bajas concentraciones de la mezcla ftalato de hidrógeno y potasio: ácido nítrico. Con el objetivo de establecer las condiciones que permitan la separación hasta línea base de las dos especies en corto tiempo y con buena simetría de los picos, se obtuvieron varios cromatogramas para la mezcla de estándares de P(III) + P(V), esto se realizó variando las concentraciones de ftalato ($2 - 10 \text{ mmol L}^{-1}$), ajustando el pH con ácido nítrico de concentración 1 mol L^{-1} (pH 2.5 – 3.5), se probaron diferentes velocidades de flujo en la columna ($0.6 - 1.5 \text{ mL min}^{-1}$) así como distintas temperaturas (de temperatura ambiente a $40 \text{ }^\circ\text{C}$). Las condiciones finales se encuentran descritas en la sección de Parte experimental; es importante indicar que la concentración de ácido nítrico en la fase móvil fue de aproximadamente de 6 mmol L^{-1} (ftalato 5 mmol L^{-1} , pH 2.5), encontrándose este valor dentro del rango previamente seleccionado (Figura 19). En la Figura 22, se presentan los cromatogramas de las dos mezclas de soluciones estándar; los resultados de la calibración y los parámetros analíticos estudiados se presentan en la Tabla 20. Aunque la línea base para m/z 47 estuvo más elevada respecto a m/z 31, el monitoreo de óxido de fósforo con las condiciones establecidas tanto para la separación cromatográfica como para el ICP-MS presentó mayor sensibilidad, menores límites de detección y mejoras en cuanto a la precisión respecto a los valores obtenidos para m/z 31 (Tabla 7). Los límites de detección evaluados como la concentración de P inyectada a la columna fue comparable con lo reportado en trabajos de especiación por LC- ICP-MS de diferentes especies de fósforo y tipos de muestras [123, 124, 127, 136, 137] aunque significativamente menor con respecto a otros procedimientos aplicados en este análisis de oxianiones de P en plantas [67-69, 121]. Como se describe en la sección de Metodología, 50 mg de biomasa fue tratada con 1 mL de la solución de extracción y el extracto obtenido fue diluido veinte veces antes de introducirlo al sistema HPLC – ICP-MS, por lo cual el límite de detección evaluado en la biomasa de la planta a m/z 31 fue de: $0.82 \text{ } \mu\text{gP g}^{-1}$ P(III), $0.87 \text{ } \mu\text{gP g}^{-1}$ P(V) y para m/z 47 de: $0.70 \text{ } \mu\text{gP g}^{-1}$ P(III), $0.63 \text{ } \mu\text{gP g}^{-1}$ P(V) (Tabla 7). Estos bajos valores son importantes características del procedimiento propuesto en este trabajo, debido a que puede llevarse a cabo la evaluación cuantitativa de la

conversión de P(III) a P(V) en plantas transgénicas. Las muestras reales analizadas fueron plantas transgénicas de tabaco diseñadas para el metabolismo de fosfito. En un primer intento, agua desionizada fue usada como extractante, como ya se ha reportado anteriormente [63, 116, 117]. Se agregó 1 mL de agua a 50 mg de una mezcla de las muestras, y se colocó en un baño ultrasónico durante 30 min a temperatura ambiente y los extractos obtenidos se limpiaron con un cartucho SPE C18.

Es importante indicar que los extractos acuosos presentaban un color verde y contenían materia orgánica, y que por lo tanto no podían ser introducidos al HPLC-ICP-MS. La eliminación de los componentes orgánicos en la muestras mediante cartuchos SPE es una práctica común y se ha reportado que es un método adecuado para limpiar las muestras en el análisis de oxianiones de P en muestras de plantas [67, 117]. Posteriormente los extractos se filtraron por membranas de 0.2 μm Supor®, certificadas para cromatografía iónica, para la eliminación de partículas finas residuales. Por último, el extracto se diluyó veinte veces antes de introducir al HPLC-ICP-MS. En el análisis por triplicado usando m/z 31 para la detección de fósforo, el fosfito no se encontró en esta muestra ($< 0.8 \mu\text{gP g}^{-1}$) y la concentración encontrada para fosfatos fue de $0.204 \pm 0.032 \text{ mgP g}^{-1}$. Para examinar la recuperación de este procedimiento, a otra porción de esta misma mezcla de muestras se adicionaron 200 μL de la solución estándar de la mezcla de fosfatos y fosfitos (50 mgP L^{-1} de cada uno) y 800 μL de agua desionizada, el resultado obtenido fue de $0.193 \pm 0.020 \text{ mgP g}^{-1}$ para P(III) y $0.368 \pm 0.037 \text{ mgP g}^{-1}$ para P(V), indicando 96.5% y 82.0% de recuperación para las dos especies, respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente, varios metales forman compuestos poco solubles con fosfatos, por lo que además a la solución de extracción se le adicionó EDTA 10 mM a pH 8 para formar complejos con los iones metálicos (principalmente Ca, Mg) y así mejorar los rendimientos de extracción de P(V). Soluciones alcalinas de EDTA (0.1M de EDTA en 0.25 mol L^{-1} de NaOH) son típicamente usadas para la extracción de fósforo del suelo (16 h en agitación) [138]; sin embargo, para la extracción de fosfato que está disponible para las plantas en el suelo, fueron usadas más bajas concentraciones de EDTA ($< 50 \text{ mmol L}^{-1}$) y condiciones menos alcalinas (pH 8 – 8.5) [139, 140], por lo que estas condiciones intermedias parecieron más adecuadas para la extracción de los oxianiones de P de la biomasa de tabaco.

Tabla 7 Parámetros analíticos evaluados para la separación por intercambio anionico de fosfato y fosfito con detección de ^{31}P y ^{47}PO por ICP-MS (valores medios, desviación estándar y CV obtenidos de cinco réplicas).

Parametro	<i>m/z</i> 31		<i>m/z</i> 47	
	P(V)	P(III)	P(V)	P(III)
Línea base \pm DE, cps ⁽¹⁾	521 \pm 17	576 \pm 20	832 \pm 29	858 \pm 24
T _{ret} \pm DE, min	6.95 \pm 0.03	7.90 \pm 0.04	6.95 \pm 0.03	7.90 \pm 0.04
Calibración ⁽²⁾	71.2c + 23	84.1c + 43	110.3c+86.4	115.1c+101
R ²	0.9994	0.9997	0.9997	0.9998
LD, $\mu\text{gP L}^{-1(3)}$	2.18	2.04	1.58	1.74
LD, $\mu\text{gP g}^{-1(4)}$	0.87	0.82	0.63	0.70
LD, $\mu\text{mol}[\text{P(III)/P(V)}] \text{g}^{-1(5)}$	9.20	10.4	6.63	8.86
LC, $\mu\text{gP L}^{-1(6)}$	3.64	3.42	2.65	2.89
CV, % ⁽⁷⁾	1.0	1.1	0.7	0.7
CV, % ⁽⁸⁾	2.7	2.5	1.5	1.4
CV, % ⁽⁹⁾	3.9	3.7	2.1	2.2

⁽¹⁾ valor adquirido en la región de elución de cada especie;

⁽²⁾ c – concentración, $\mu\text{gP L}^{-1}$;

⁽³⁾ límite de detección evaluado en base a seis desviaciones estándar de la línea base medido en la región de elución del analito;

⁽⁴⁾ límite de detección referido como masa de fósforo por gramo de biomasa;

⁽⁵⁾ LD como μmol de cada especie (fosfito y fosfato) por gramo de biomasa;

⁽⁶⁾ límite de cuantificación evaluado en base a diez desviaciones estándar de la línea base medido en la región de elución del analito;

⁽⁷⁾ coeficiente de variación representando la precisión instrumental para $250 \mu\text{gP L}^{-1}$;

⁽⁸⁾ coeficiente de variación representando la precisión dentro de la corrida $250 \mu\text{gP L}^{-1}$;

⁽⁹⁾ coeficiente de variación representando la precisión entre corridas para $250 \mu\text{gP L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos para esta misma mezcla de muestras en el Segundo experimento fue de $0.231 \pm 0.037 \text{ mgP g}^{-1}$ para P(V) y no fue detectado P(III); para la muestra con adición de estándar se encontró $0.419 \pm 0.035 \text{ mgP g}^{-1}$ como P(V) y $0.197 \pm 0.028 \text{ mgP g}^{-1}$ como P(III), los valores en los porcentajes de recuperación fueron de 94.2% y 98.6% para las dos especies respectivamente. En base a estos resultados la extracción con EDTA y dos etapas en el proceso de purificación fueron aplicados en los subsecuentes análisis.

En la Figura 22, son presentados los cromatogramas adquiridos a m/z 31 y m/z 47 para el extracto de planta (muestra 3) y para la muestra con adición de estándar. Específicamente, 100 μL de la mezcla de solución estándar (50 mgP L^{-1} P(III) y 50 mgP L^{-1} P(V)) fueron adicionados a 50 mg de biomasa, la cual posterior a la extracción, limpieza y dilución, la adición de estándar resulto en una concentración de $250 \mu\text{gP L}^{-1}$ de cada especie en la solución final.

En la Figura 22, también se incluyen los cromatogramas de dos soluciones de calibración, las cuales permiten la confirmación de la identidad de las especies. Se puede observar que la línea base para m/z 31 fue menor al compararla con m/z 47; sin embargo en ella se presenta mayor ruido que concuerda con las figuras 19, 20 y Tabla 7. Tres muestras de diferentes plantas fueron analizadas y los resultados obtenidos para la detección de los dos valores de m/z presentaron valores similares; sin embargo el ion óxido de fósforo resulto presentar mejor precisión comparado contra el ion elemental (Tabla 8). Efectivamente, lo mencionado anteriormente puede ser confirmado, ya que la desviación estándar relativa para la determinación de P(V) estuvo alrededor de 5% para m/z 47 y 9% para m/z 31 (Tabla 8). Para el chequeo de la exactitud, la determinación se realizó mediante la adición de estándar de dos puntos ($250 \mu\text{gP L}^{-1}$ y $500 \mu\text{gP L}^{-1}$ de las dos especies en la solución inyectada al sistema cromatográfico). Los resultados cuantitativos fueron concordantes con los obtenidos por la cuantificación por calibración externa (Tabla 8). En las muestras 2 y 3, solo se encontró fosfato, mientras que en la muestra 1 se encontró una baja cantidad de fosfito. La interpretación biológica de los datos analíticos no forma parte de este trabajo, sin embargo ha de ser recalado que los resultados obtenidos en este trabajo fueron consistentes con los previamente reportados para estas mismas plantas transgénicas [64]. En particular, las muestras 1-3 corresponden a plantas crecidas con fosfito como única fuente de fósforo y los resultados de especiación confirman la eficiente oxidación de P(III) a P(V) por las plantas.

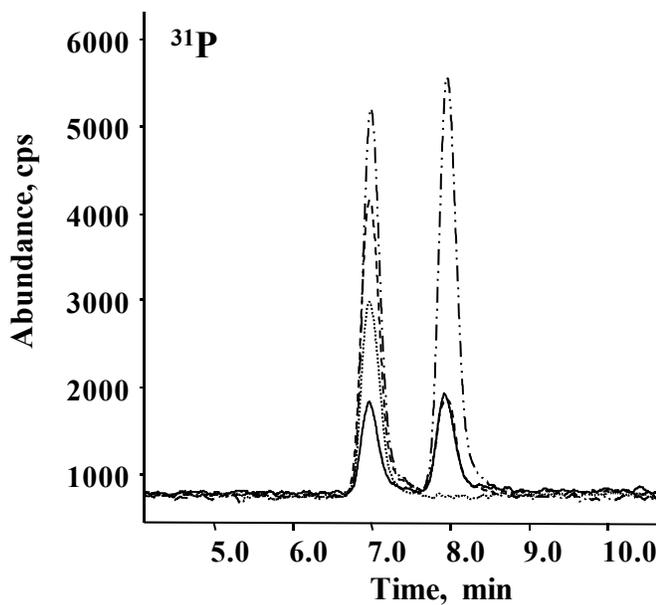
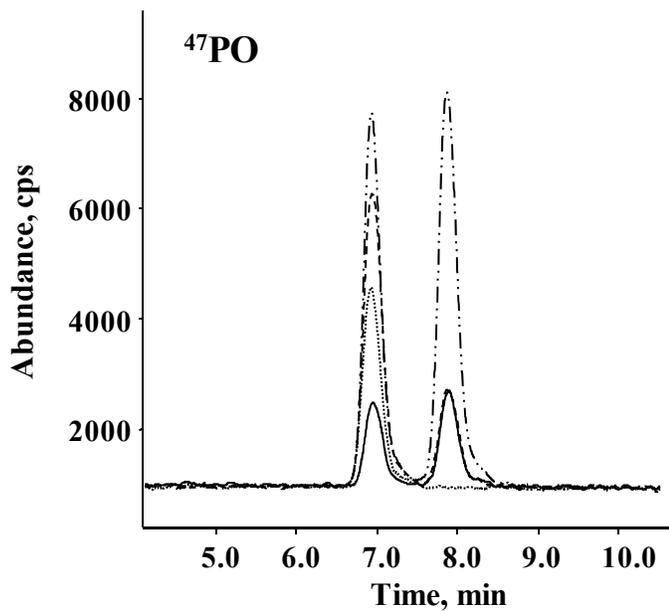


Figura 22 Cromatogramas obtenidos por HPLC – ICP-MS: (—) mezcla de estándares de fosfato + fosfito, $250 \mu\text{gP L}^{-1}$ de cada uno; (-·-·-) mezcla de estándares de fosfato + fosfito standard mix, $1000 \mu\text{gP L}^{-1}$ de cada uno; (·····) extracto de planta; (----) extracto de planta con adición de estándar de P(III) + P(V), $250 \mu\text{gP L}^{-1}$ de cada uno: (a) m/z 47, (b) m/z 31.

Tabla 8 Resultados de la cuantificación obtenidos en el análisis de muestras de plantas por los procedimientos propuestos con detección en m/z 31 y m/z 47 por ICP-MS. Valores de concentración medios con su respectiva DE son presentados basados en el análisis por triplicado de cada biomasa.

Muestra	Calibración externa		Adición estándar		Recuperación, %	
	P(III)	P(V)	P(III)	P(V)	P(III)	P(V)
<i>m/z 47, mgP g⁻¹ (ps) ± DE</i>						
1	0.035 ± 0.009	0.296 ± 0.015	0.032 ± 0.016	0.304 ± 0.019	99.1	97.2
2	Nd	0.266 ± 0.012		0.270 ± 0.023	101.2	99.7
3	Nd	0.203 ± 0.016		0.215 ± 0.027	98.6	94.2
<i>m/z 31, mgP g⁻¹ (ps) ± DE</i>						
1	0.025 ± 0.010	0.274 ± 0.024	0.028 ± 0.015	0.289 ± 0.031	97.2	94.5
2	Nd	0.255 ± 0.021		0.283 ± 0.019	98.0	93.2
3	Nd	0.179 ± 0.017		0.202 ± 0.024	97.8	95.1

IV.3.5. CONCLUSIÓN

Ha sido demostrada la factibilidad del monitoreo de fósforo a m/z 47 para la determinación de fosfito y ortofosfato en material de plantas por cromatografía de intercambio aniónico con detección por ICP-MS. En este procedimiento, usando ftalato de hidrógeno y potasio como fase móvil, la cual contiene concentración milimolar de ácido nítrico, permitió en un tiempo de diez minutos el análisis de las dos especies con una resolución hasta línea base, favoreciendo la formación de iones de óxido de fósforo en el plasma. Los resultados obtenidos en el análisis de plantas transgénicas usando dos modos de detección (m/z 31 y 47) fueron concordantes, sin embargo el monitoreo del ion óxido de fósforo presentó límites de detección más bajos y mejor precisión. Más importante es que la celda de colisiones/reacciones no fue necesaria para el monitoreo del ion óxido de fósforo, por lo cual este procedimiento puede ser llevado a cabo en cualquier instrumento ICP-MS. Varios estudios biotecnológicos se enfocan actualmente en el fosfito como fuente alternativa de fósforo para las plantas; el utilizar fosfito recae en el hecho de que existe una oxidación *in vivo* a fosfato, la implementación del procedimiento propuesto proveerá información analítica útil y complementaria en dichos estudios.

IV.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GIBBERÉLICO EN PRODUCTOS AGROQUÍMICOS POR ESPECTROMETRÍA UV/VIS CON EL USO DE ESTÁNDAR INTERNO

Las gibberelinas (GAs) son ácidos diterpenos tetracíclicos naturales, cuya estructura básica está constituida por un anillo de ent-gibberelano Figura 23, algunos de los cuales poseen actividad hormonal [141].

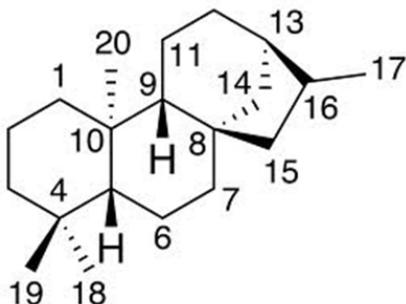


Figura 23 Estructura química del ent-gibberelano

Actualmente hay más de 140 gibberelinas aisladas de tejidos vegetales, que han sido identificadas químicamente. La más conocida del grupo es la GA3 (ácido gibberélico), producida por el hongo *Gibberella fujikuroi*. El ácido gibberélico es un metabolito secundario que ejerce la función de fitohormona, mediante la regulación del crecimiento en diferentes etapas del desarrollo de las plantas. Es por ello que este compuesto se utiliza en la agricultura para mejorar el rendimiento de los cultivos y para su protección contra diferentes tipos de estrés[142].

Para llevar a cabo el control del proceso industrial de la biosíntesis del ácido gibberélico, la evaluación de su rendimiento y el control de calidad de los productos agroquímicos, se buscan los procedimientos relativamente simples y robustos, que sin embargo aseguren buena calidad de los resultados. Asimismo, los principios de química verde obligan a reducir la generación de residuos potencialmente contaminantes en los laboratorios, lo que involucra el desarrollo de los ensayos en micro-escala. Para satisfacer los requerimientos que se acaban de presentar, el presente trabajo se enfoca en la modificación del procedimiento espectrofotométrico de la determinación de GA3 propuesto anteriormente [143] y utilizado extensamente por varios autores [144-147], con el fin de convertirlo en un procedimiento no-riguroso, con bajo requerimiento de los reactivos y disolventes, pero al mismo tiempo confiable en términos de precisión y exactitud.

La modificación consistirá en la aplicación de un estándar interno y en diseñar el protocolo en escala micro.

IV.4.1. Objetivo

Desarrollar un nuevo procedimiento espectrofotométrico en escala micro con el uso de estándar interno, para la determinación de ácido gibberélico en productos agroquímicos y también demostrar su confiabilidad mediante la comparación de los resultados con los obtenidos por cromatografía de líquidos y de gases.

IV.4.2. Parte experimental

Solución patrón de ácido gibberélico (GA3) 1.8 g L^{-1} , se preparó tomando del 100mg del estándar comercial (90% GA3, grado HPLC) y se disolvió con 50mL de metanol al 70%. Soluciones de los estándares internos a 0.1 g L^{-1} (3-nitrofenol, 4-nitrofenol, Azul nilo, Mordiente azul I, Vede brillante, Rojo Congo y Azul de metileno), para cada estándar interno se preparó una solución patrón tomando 10mg y disolviendo hasta 10mL con agua milli Q, posteriormente se tomaron $100 \mu\text{L}$ de la solución patrón y se disolvieron con $900 \mu\text{L}$ de agua. Se prepararon soluciones de fosfato de amonio dibasico 100mM, los pHs de cada solución fueron 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 .

Muestras biológicas

- Se prepararon soluciones de 1 g L^{-1} de agroquímicos (GibGro(10% de GA3, Nufarm®), Activol 40% GS(40% de GA3, Valent Biosciences®), Biogib 10PS(10% de GA3, Grupo Bioquímico Mexicano®) y Gibiotin 101(8.2% de GA3, AGRO-GROW®)).

Procedimiento espectrofotométrico propuesto en este trabajo

Se tomaron $50 \mu\text{L}$ de muestra o del estándar de ácido gibberélico agregando $50 \mu\text{L}$ del estándar interno (mordiente azul I, 65 mg L^{-1}) y $15 \mu\text{L}$ de HCl 6N. La extracción se llevó a cabo con dos porciones de acetato de etilo ($75 \mu\text{L}$ cada una); se re-extrajo el compuesto y el EI con $50 \mu\text{L}$ de un tampón de fosfatos 10mM a pH 10.5, se adicionó $200 \mu\text{L}$ de una mezcla de etanol:HCl 6N (1:3) y se dejó reaccionar durante 40 min. Finalmente, se registraron los espectros UV/Vis en

el intervalo de 240 – 600 nm, se obtuvo la primera derivada y la señal analítica del ácido gibberelénico definida como $S = S_{\text{analito}}/S_{\text{EI}} = {}^1D_{267.64\text{nm}}/{}^1D_{421.64\text{nm}}$.

Procedimiento de determinación del ácido gibberélico por cromatografía de líquidos

Se prepararon soluciones de estándar de concentración 0, 25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disueltas en la 40mM de H_3PO_4 a pH 2.5. A partir de las soluciones de las muestras se tomó una alícuota de 20 μL , se disolvió a 1 mL con la fase móvil y se inyectó en la columna cromatográfica. Se utilizó el cromatógrafo de líquidos, las condiciones experimentales de separación se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9 Condiciones de análisis de GA3 en cromatografía de líquidos.

Volumen de inyección			20 μL		
Flujo			1.0 mL min ⁻¹		
Temperatura de la columna			30°C		
Gradiente	Tiempo(min)	Agua, %	40mM H ₃ PO ₄ , %	MeOH, %	MeCN, %
	0.0	37	25	38	0
	8.0	37	25	38	0
	9.0	27	25	38	10
	11.0	27	25	38	10
	11.5	37	25	38	0
Detección UV			206 nm		

Metodología de análisis por cromatografía de gases

Se prepararon soluciones de estándar de concentración 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg mL^{-1} , disueltas en piridina. Con el fin de convertir al ácido gibberélico en una especie volátil, se llevó a cabo la derivatización con la mezcla de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida y trimetilclorosilano (BSTFA-TMCS, Supelco) a 70°C durante 15 minutos. A partir de las soluciones de las muestras se tomó una alícuota de 100 μL y se secó al vacío a 45°C, posteriormente se redisolvió al mismo volumen con piridina: BSTFA-TMCS(1:1) y se hicieron reaccionar al igual que los estándares. Las condiciones experimentales de separación se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10 Condiciones de análisis para el GA3 por cromatografía de gases

Gas acarreador	Hidrógeno	Flujo	1.6 mL min ⁻¹
Inyección	Split 1:20	Volumen	1 μL
Temperatura del inyector		250°C	
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temperatura, °C	Permanencia, min
	-	170	1
	20	270	0
	10	340	1
Temperatura del detector		360°C	
Flujos en el detector		H ₂ : 45mL/min Aire: 450mL/min	

IV.4.3. Resultados y discusión

En la Figura 24 se presenta el esquema general del trabajo experimental realizado. Se desarrolló un nuevo procedimiento espectrofotométrico en micro escala, en el que a la muestra original se agrega el estándar interno (EI), ambos compuestos se extraen con un solvente orgánico (para eliminar la matriz de muestra) y, después de su re-extracción a fase acuosa, se obtiene la conversión de GA3 en el ácido giberelénico, sin afectar la estructura del EI. Finalmente se registraran los espectros UV/Vis de las muestras (o soluciones de calibración) y se realiza la cuantificación definiendo la señal analítica como la relación $S = S_{\text{analito}}/S_{\text{EI}}$. Para fines comparativos, las mismas muestras fueron analizadas mediante dos procedimientos alternativos, adoptados de la literatura: por cromatografía de líquidos y de gases.

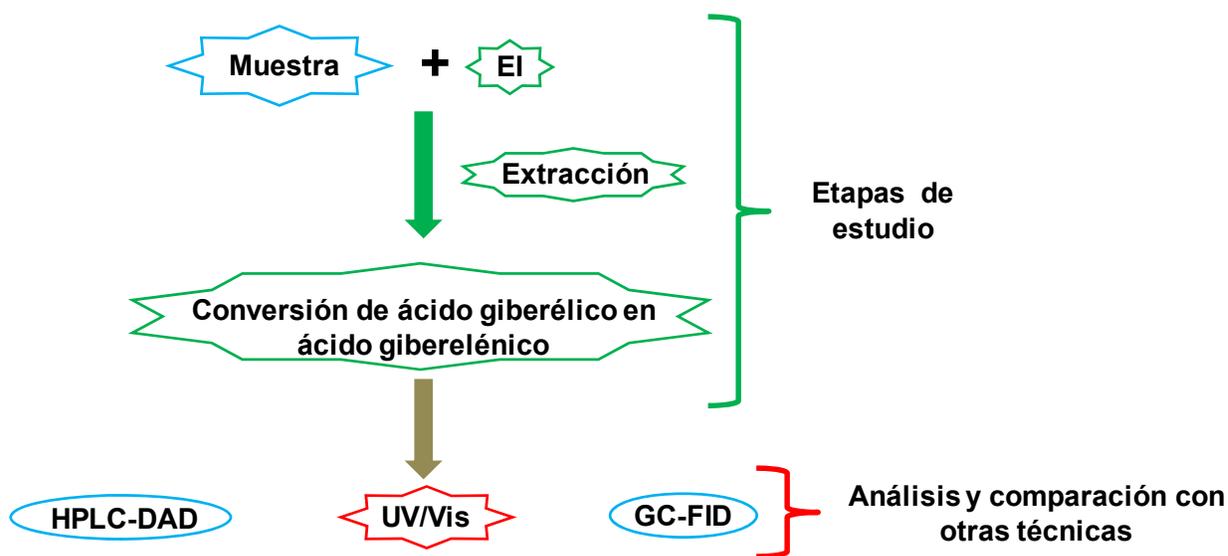


Figura 24 Esquema general de trabajo.

Desarrollo del método espectrofotométrico

La idea original del trabajo fue modificar la metodología desarrollada por Berrios y col. (28), con el fin de llevar el procedimiento a micro escala y asegurar buena precisión y exactitud de los resultados. Para eliminar errores analíticos aleatorios, debido a un procedimiento no riguroso en micro escala, se propuso el uso del método de estándar interno (EI). Las etapas del desarrollo del procedimiento fueron las siguientes. (i) selección de EI; (ii) estudio de las condiciones experimentales en la conversión del GA3 en el ácido gibberelénico (pH, tampón, temperatura y tiempo de reacción); (iii) selección de solvente orgánico en la etapa de extracción del analito e IS de la muestra original; (iv) evaluación de las condiciones de adquisición de señal analítica ($S = S_{GA3}/S_{EI}$) adecuadas para la cuantificación; (v) evaluación de los principales parámetros analíticos del procedimiento.

Selección del EI

Tomando en cuenta los requisitos para EI en espectrofotometría, el compuesto seleccionado tiene que comportarse como el analito durante el procedimiento analítico; en concreto tiene que ser extraído a solvente orgánico junto con GA3 y no debe afectar la estabilidad del analito. Además su espectro de absorción en la región UV/vis no debe solaparse con la banda de absorción del analito. Es necesario mencionar que, el GA3 al convertirlo en ácido gibberelénico presenta su banda de absorción con el máximo en 254 nm, así que, se buscó un EI con la banda de absorción resuelta lo mejor posible respecto a la banda del analito. En la búsqueda de un EI apropiado, se tomó en cuenta una serie de compuestos como el 3-nitrofenol, 4-nitrofenol, mordiente azul I, rojo congo, azul de metileno, azul nilo y verde brillante (Figura 25). Se realizaron pruebas de extracción del analito y de EI con acetato de etilo, siguiendo la metodología de Berrios [147] y se encontró que únicamente el 3-nitrofenol, el 4-nitrofenol y el mordiente azul I podrían ser considerados como candidatos adecuados del EI, el azul de metileno y rojo congo no presentaban extracción en la etapa inicial y en cuanto al verde brillante y el azul nilo, éstos no presentaban re-extracción de la fase orgánica a la fase acuosa alcalina [147].

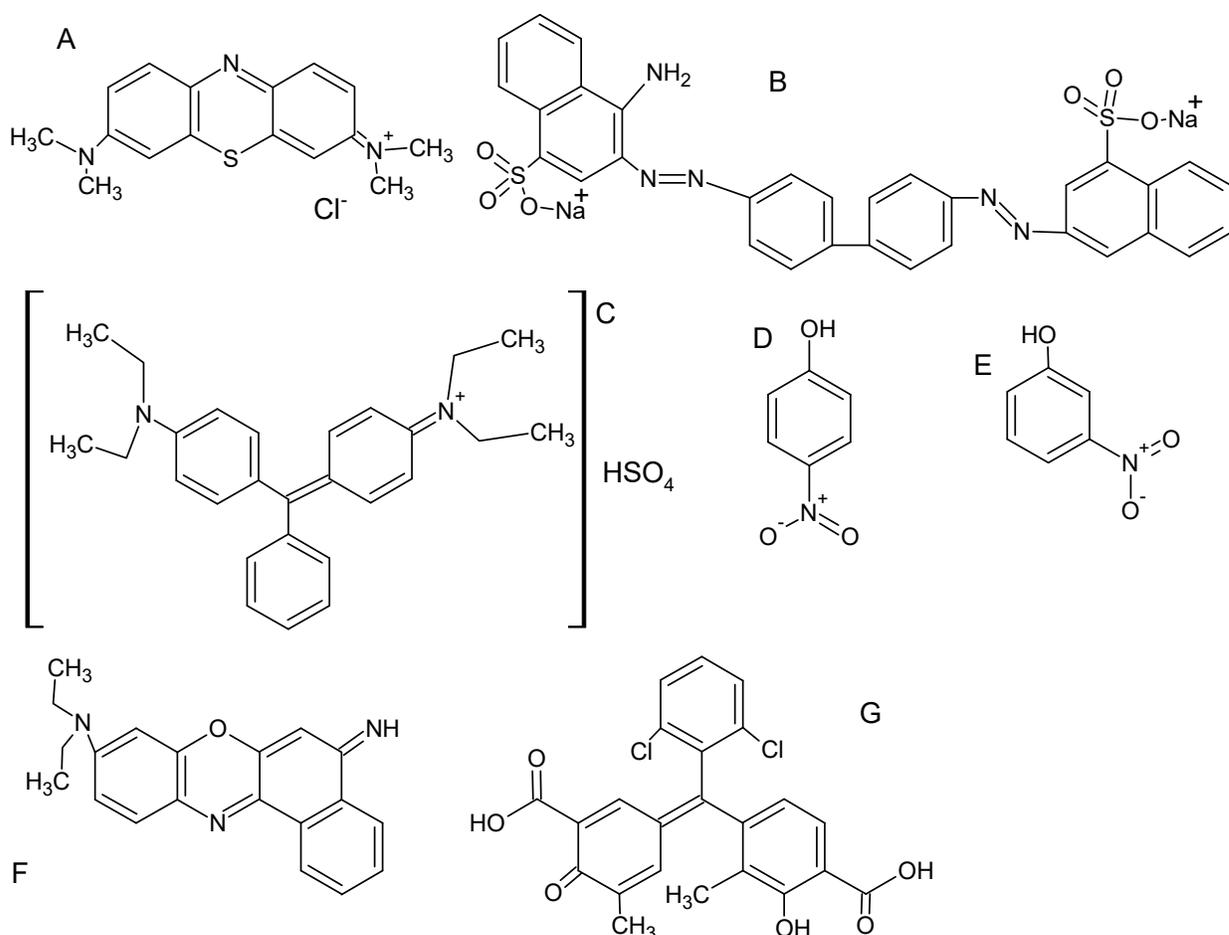


Figura 25 Estructura de algunos compuestos examinados como posibles EI en este trabajo. A- Azul de metileno; B-Rojo congo; C-Verde brillante, D- 4-Nitrofenol; E- 3- Nitrofenol; F-Azul nilo; G – Mordiente azul I

Para evaluar el cumplimiento del criterio espectral, se obtuvieron los espectros UV/Vis del ácido gibberelénico y de los candidatos a IS. Para ello, se tomaron 50 μL de la solución estándar de GA3, se mezcló con 50 μL de EI (100mg L^{-1}), se adicionaron 10 μL de HCl 6N y la extracción se llevó a cabo con 150 μL de acetato de etilo. Posteriormente, la re-extracción a fase acuosa se obtuvo agregando 100 μL de hidróxido de amonio al 10% y finalmente se llevó a cabo la conversión de GA3 al ácido gibberelénico adicionando 400 μL de una mezcla de HCl 12N:metanol (1:2) (10 minutos a temperatura ambiente).

Se evaluó como primer compuesto el 3-nitrofenol, observándose un solapamiento de su espectro de absorción con la banda de absorción del ácido gibberelénico (Figura 26) y debido a esta característica fue descartado. Posteriormente se hicieron pruebas con el 4-nitrofenol, este

compuesto presenta su banda de absorción a 318 nm, como se puede observar en la Figura 27, en longitud de onda 254 nm, se puede obtener la señal del analito sin contribución espectral del 4-Nitrofenol, pero la banda de este candidato a EI no está resuelta del espectro de analito.

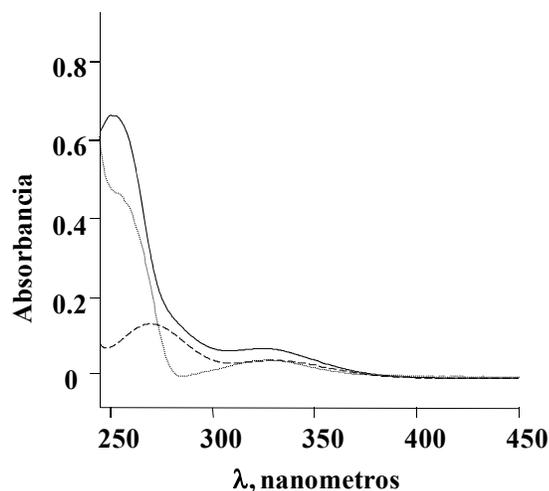


Figura 26 Espectro de absorción correspondiente a 100 μ g/mL de 3-nitrofenol(---), 100 μ g/mL de GA3 (•••) y mezcla de GA3 con 3-nitrofenol (—).

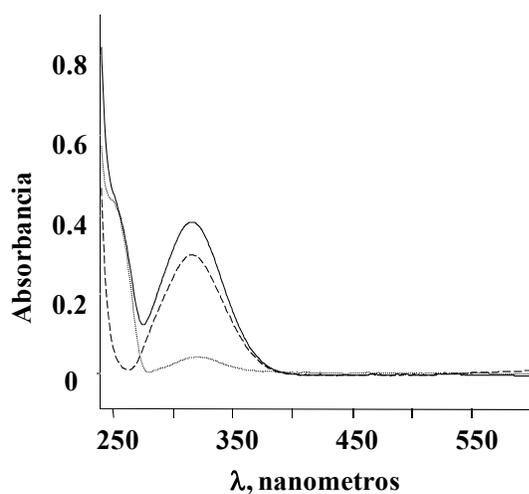


Figura 27 Espectro de absorción correspondiente a 100 mg L⁻¹ de 4-nitrofenol (---), 100mg L⁻¹ de GA3 (•••) y mezcla de GA3 con 4-nitrofenol (—).

Finalmente, se procedió a la evaluación del mordiente azul I. La banda de absorción de este compuesto con el máximo en 465 nm no presentó solapamiento ninguno con el espectro del analito. Por su parte, el mordiente azul sí presentó una pequeña contribución espectral en la región de la banda espectral del analito, sin embargo dicha contribución fue relativamente constante, sugiriendo que el procedimiento de derivatización de espectros permita lograr una excelente resolución de las señales de los dos compuestos, por lo que se decidió continuar con el

uso de este EI (Figura 28). En primera instancia, la señal del EI fue definida como absorbancia en 465 nm y la señal del analito como absorbancia en 254 nm.

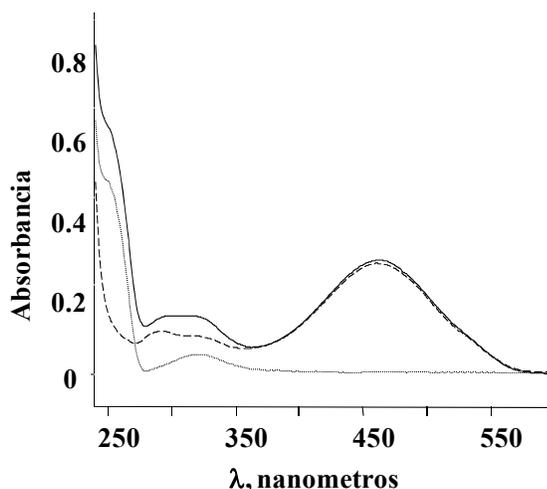


Figura 28 Espectro de absorción correspondiente a 65 mg L^{-1} de mordiente azul I (---), 100 mg L^{-1} de GA3 (•••) y mezcla de GA3 con mordiente azul I (—).

Selección del concentración de HCl

Para asegurar buen rendimiento de extracción del GA3 a la fase orgánica, fue necesaria la acidificación del medio [147]. Además del analito, en el presente trabajo fue necesaria la extracción del EI, por lo que se evaluó el efecto de la concentración del ácido clorhídrico en las señales de ambos compuestos. Para ello, a una solución de 200 mg L^{-1} GA3 y 65 mg L^{-1} del IS se agregaban diferentes alícuotas del HCl 6N ($0 - 15 \mu\text{L}$), se realizó el proceso de re-extracción, conversión de GA3 y se obtuvieron finalmente las absorbancias en 254 nm (analito) y en 465 nm (EI). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 18, donde se observa una tendencia de aumento de ambas señales con mayores cantidades del ácido agregado. Con base en estos resultados se seleccionó el volumen del ácido de $15 \mu\text{L}$ (Figura 29).

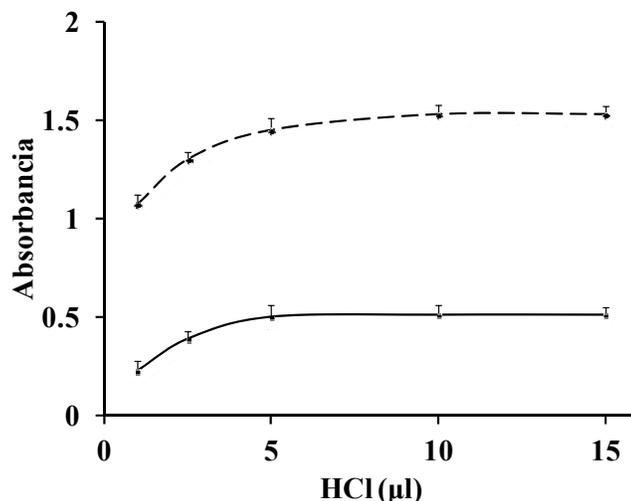


Figura 29 Señales de absorción del mordiente azul 65 mg L^{-1} en 465 nm (—) y ácido gibberelénico 200 mg L^{-1} en 254 nm (---) en función del volumen de HCl 6N

Selección del solvente

Una vez elegido el EI, la acidez del medio y las condiciones para adquirir las señales de los dos compuestos, se examinaron diferentes solventes orgánicos en la etapa de extracción inicial, donde hasta ahora se utilizó el acetato de etilo propuesto en el método original [147]. Se decidió llevar a cabo la extracción con dos porciones del solvente de 75 uL cada una (en lugar de una porción con 150 uL) para mejorar el rendimiento final. Se probaron varios solventes tales como acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, metiletilcetona y metilisobutilcetona, después de la extracción se procedió con las restantes etapas del procedimiento y se adquirieron en cada uno de los casos los espectros del analito, del EI y de las mezclas de ambos. A manera de ejemplo, en la Figura 30 se presentan los espectros de absorción de mezclas analito + IS para diferentes solventes. Como se puede observar, el espectro del EI no fue afectado por el cambio del disolvente, logrando el rendimiento de extracción de 97-100%. Este rendimiento fue evaluado mediante comparación de la absorbancia en 465 nm de la solución del EI en disolvente dado contra la absorbancia después de aplicar el procedimiento entero. Por otro lado, la selección del solvente para la extracción y adquisición de la señal del ácido gibberelénico es muy importante, como se puede observar el acetato de etilo y el cloroformo podrían considerarse (rendimiento de extracción 100% y 94% , respectivamente) pero debido a la alta toxicidad del cloroformo, se seleccionó el acetato de etilo para los estudios posteriores.

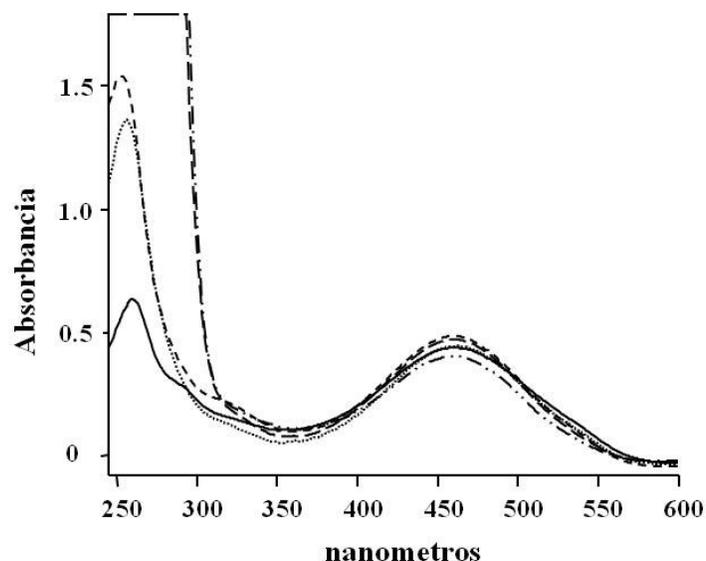


Figura 30 Espectros de absorción de mezclas analito (200 mg L^{-1}) y del EI (65 mg L^{-1}) obtenidos empleando en la extracción los siguientes solventes orgánicos: Metilacetato de etilo(— · —), Metilisobutilcetona(— · · —), Acetato de etilo(- - -), Cloroformo(· · ·) y Diclorometano(—).

Selección del pH del tampón de fosfatos

En el método original, la re-extracción del analito se realizó utilizando un tampón de fosfatos (pH 7.4) [147], sin embargo en este trabajo para altas concentraciones de GA3 se observó una disminución de la señal. De esta manera, se estudió el efecto del pH del tampón ($50 \mu\text{L}$, 100 mM) sobre la magnitud de la absorbancia del analito (254 nm) y del EI (465 nm). Como se puede observar en la Figura 31, la extracción del GA3 a distintas concentraciones y del EI, indican que la mejor extracción se obtiene en el intervalo de pH entre 10-11, por lo que para llevar a cabo el análisis se seleccionó el pH de 10.5.

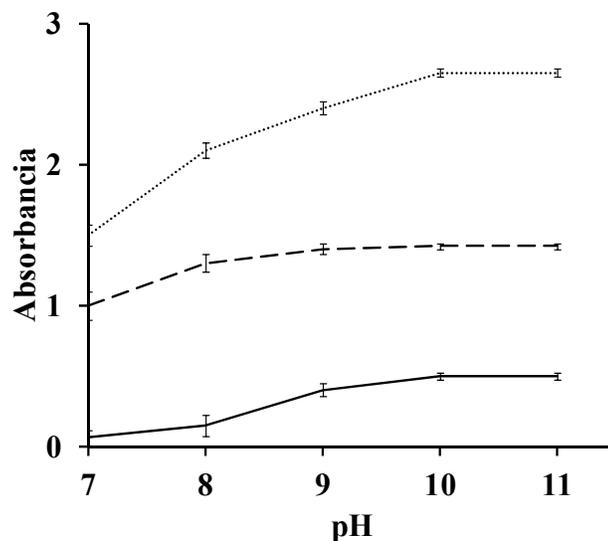


Figura 31 Efecto del pH del tampón de fosfatos en las señales de absorción del mordiente azul 65mg L^{-1} (—) (465 nm), ácido gibereliénico 200 mg L^{-1} (---) y 500mg L^{-1} (•••) (254 nm)

Selección del tiempo de reacción

Berrios[147] reportó que el tiempo de reacción de conversión puede ser entre 2 min y 60 min, mientras que para tiempos más largos, la señal tiende a disminuir. En los experimentos preliminares de este trabajo, se observó que el tiempo de reacción es importante, por lo que se realizó un seguimiento de la conversión de GA3 a ácido gibberelénico por cromatografía de líquidos. Para ello, se obtuvo la separación cromatográfica de los dos compuestos, utilizando para la detección de GA3 la longitud de onda de 206 nm, para el ácido gibberelénico 245 nmy para el EI 465 nm. Una vez preparada la mezcla de reacción, ésta se inyectó en el sistema cromatográfico registrando las señales de los tres compuestos contra el tiempo de reacción. A manera de ejemplo, en la Figura 32 se presentan dos cromatogramas correspondientes a la mezcla inicial y al tiempo de reacción de 20 min. En la Figura 33 se presentan los resultados obtenidos para GA3 (•••), ácido gibberelénico (—) y la absorbancia del EI (---). Se puede observar que el tiempo de reacción no influye en la señal analítica del IS y que después de 40 min se logra el más alto grado de conversión del analito, que no aumenta en tiempos más largos.

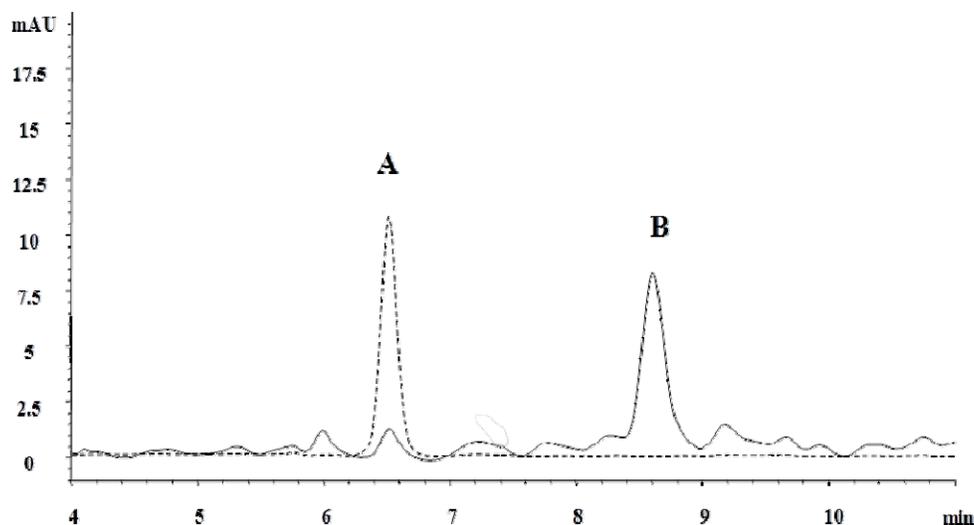


Figura 32 Cromatograma de la solución estándar de 20mg L^{-1} después de 20 minutos de reacción, la señal A corresponde al ácido gibberelénico y la B al GA3.

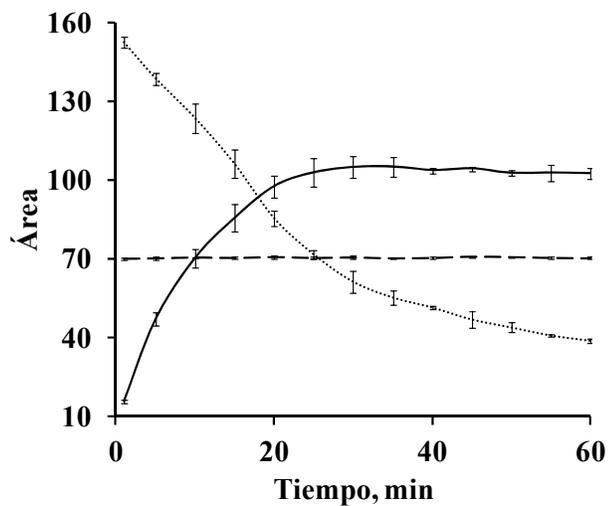


Figura 33 Seguimiento de la conversión de 100mg L^{-1} de ácido gibberélico(···) en ácido gibberelénico(—), se presentan las áreas de los picos cromatográficos correspondientes (HPLC). Para el EI (65mg L^{-1}) se midió la absorbancia en la mezcla de reacción en 465 nm .

Condiciones de cruce en cero

Debido a que la señal del ácido gibberelénico no presenta un máximo definido se procedió a evaluar, el espectro derivado del compuesto al igual que el EI para poder realizar una mejor cuantificación del analito. Encontrándose que los mejores parámetros de trabajo fueron en un rango de lectura de 240-600nm, un filtro de suavizado con 31 puntos, un ajuste a línea base en 550 nm, y se calculó la primera derivada de los espectros de absorción usando el procedimiento Savitzky–Golay ($\Delta\lambda = 5$ nm). Las condiciones de cuantificación por el método de cruce en cero fueron las siguientes: primera derivada en 267.64nm correspondió a la señal neta del ácido gibberelénico y la primera derivada en 421.64nm fue la señal neta del mordiente azul I (Figura 34).

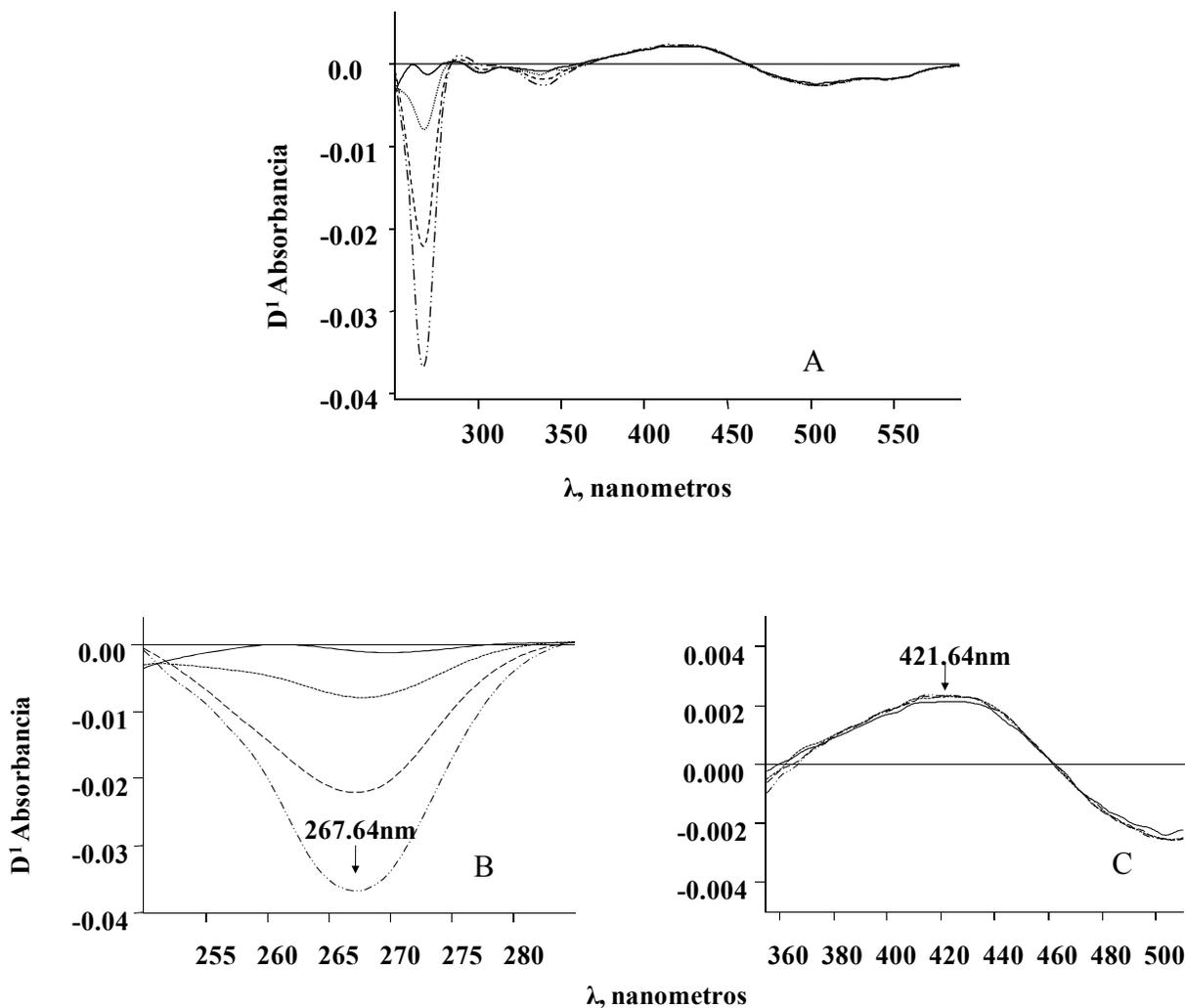


Figura 34 Primera derivada de espectros de las soluciones de calibración del ácido gibberelénico observando el espectro completo de lectura(A) y acercamiento a las soluciones de calibración de ácido gibberelénico 0, 20, 60, y 100 mg L⁻¹(B) y del EI mordiente azul I 65mg L⁻¹(C)

Procedimiento espectrofotométrico propuesto

En la Tabla 11 se resumen los principales parámetros analíticos evaluados con base del proceso de calibración sin y con estándar interno. De esta manera, en la columna 2 de la tabla se presentan los valores obtenidos tomando la absorbancia del analito como señal analítica ($S = A_{254\text{nm}}$), en la columna 3 la señal fue definida como la relación de absorbancias del analito y EI ($S = A_{254\text{nm}} / A_{465\text{nm}}$), en la columna 4 como primera derivada de absorbancia del analito ($S = {}^1D_{267.64\text{nm}}$) y en la columna 5 tomando como la señal analítica la relación entre primeras derivadas de Analito y EI ($S = {}^1D_{267.64\text{nm}} / {}^1D_{421.64\text{nm}}$).

Tabla 11 Parámetros analíticos del procedimiento espectrofotométrico propuesto, evaluados con base en diferentes señales analíticas

	Espectros de cero orden		Espectro derivados de primer orden	
	Sin EI	Con EI	Sin EI	Con EI
Señal analítica, S	$A_{254\text{nm}}$	$A_{254\text{nm}} / A_{465\text{nm}}$	${}^1D_{267.64\text{nm}}$	${}^1D_{267.64\text{nm}} / {}^1D_{421.64\text{nm}}$
Calibración, mg/mL	0.09 - 0.8	0.09 - 0.8	0.03 - 1.7	0.01 - 1.7
Ecuación de cal.*	$S=3.224x+0.078$	$S=10.89x+ 0.26$	$S=0.0411x+0.0003$	$S=30.97x+0.71$
R^2	0.9867	0.9995	0.9938	0.9998
LD, $\mu\text{g/mL}$	28.0	10.1	9.28	3.30
LC, $\mu\text{g/mL}$	93.2	33.6	30.9	11.0
CV, % (0.1mg/mL GA3)	5.32	1.26	1.31	0.40
CV, % (0.5 mg/mL GA3)	2.62	0.43	0.39	0.13

* Función de regresión lineal, x – concentración del GA3, mg/mL.

Los resultados obtenidos (Tabla 11) demuestran que el empleo del EI permite mejorar la precisión del procedimiento así como lograr más bajos límites de cuantificación y detección. Por otro lado, se observa que la cuantificación con base en las primeras derivadas de los espectros es más adecuada en términos de mejor precisión y poder de detección.

El procedimiento desarrollado se utilizó en la determinación de GA3 en los productos agroquímicos comerciales, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 12; en esta

tabla también se presentan los valores reportados por el fabricante. De manera general se observa que los resultados obtenidos utilizando espectros de orden cero tienden a ser más altos que los obtenidos con base en espectros derivados. Por otra parte, los resultados obtenidos empleando el método de EI presentaron valores más bajos de DE respecto a los obtenidos, considerando únicamente la señal del analito. Finalmente, para los tres primeros productos comerciales, los resultados del análisis fueron cercanos a los valores reportados por el fabricante; sin embargo el producto Gibiotin aparentemente no cumple con el valor de etiqueta. Para evaluar la exactitud de resultados se llevó a cabo el análisis de los mismos productos mediante dos procedimientos alternativos, mismos que se describen a continuación.

Tabla 12 Resultados de determinación de GA3 en productos comerciales obtenidos utilizando micro procedimiento espectrofotométrico propuesto (para fines comparativos se incluyen los valores reportados por el fabricante)

Producto	Concentración de GA3 en la muestra \pm DE, % (m/m)				Valor reportado, % (m/m)
	$A_{254\text{nm}}$	$A_{254\text{nm}}/ A_{465\text{nm}}$	$A_{254\text{nm}}$	$A_{254\text{nm}}/ A_{465\text{nm}}$	
Gibgro10%	8.29 \pm 0.44	13.4 \pm 0.10	7.48 \pm 0.11	12.0 \pm 0.03	10
Activol 40%	42.5 \pm 2.26	37.0 \pm 0.54	44.2 \pm 0.56	36.1 \pm 0.17	40
Biogib 10%	6.36 \pm 0.34	8.58 \pm 0.08	6.21 \pm 0.08	7.11 \pm 0.03	10
Gibiotin 101 8.2%	0.57 \pm 0.03	1.04 \pm 0.01	0.44 \pm 0.01	0.65 \pm 0.00	8.2

Determinación del ácido gibberélico por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica

Siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental, se llevó a cabo la calibración y posteriormente la determinación de GA3 en los agroquímicos comerciales (Gibgro, Activol, Biogib y Gibiotin 101). La identificación del GA3 en los cromatogramas de muestras reales fue mediante la comparación de tiempo de retención del compuesto eluido con el del estándar comercial. Como ejemplo, en la Figura 35 se presenta el cromatograma del estándar del GA3 y el cromatograma obtenido en el análisis de un producto comercial.

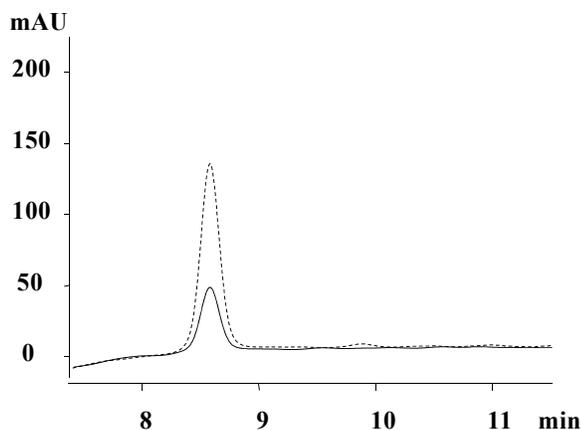


Figura 35 Cromatograma de la solución estándar de 0.1mg mL^{-1} (•••) y la muestra Biogib (—)

En la Tabla 13 se presentan los principales parámetros analíticos del procedimiento y en la Tabla 14 los resultados de la cuantificación obtenidos para todos productos agroquímicos analizados junto con el valor reportado por el fabricante. Estos resultados fueron obtenidos mediante la calibración externa, tomando el área del pico cromatográfico como la señal analítica del GA3. Se puede observar que únicamente el producto Gibgro posee una cantidad mayor de GA3 y que el resto de los agroquímicos cuentan con una concentración por debajo de lo indicado, en el caso del producto Gibiotin 101 no se detectó señal del GA3.

Tabla 13 Principales parámetros analíticos evaluados en la determinación del GA3 por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica.

Parámetro	Valor
Tiempo de retención \pm DE, min	8.62 ± 0.08
Señal analítica (S)	Área del pico cromatográfico
Intervalo de calibración, $\mu\text{g/mL}$	1-1800
Ecuación de regresión lineal	$S = 2334 x - 2.54$
R^2	0.9999
LD, $\mu\text{g/mL}$	0.10
LC, $\mu\text{g/mL}$	0.34
CV, % (0.1mg/mLGA3)	0.03
CV, % (05 mg/mLGA3)	0.01

Tabla 14 Resultados de cuantificación del GA3 en productos agroquímicos, obtenidos por el método y los contenidos reportados por el fabricante (nd - no detectado)

Producto	resultado de este trabajo \pm DE, % (m/m)	Concentración indicada en el empaque, %, (m/m)
Gibgro	10.4 \pm 0.003	10
Activol	33.5 \pm 0.010	40
Biogib	7.48 \pm 0.002	10
Gibiotin 101	nd	8.2

Determinación de ácido gibberélico por cromatografía de gases con detección por ionización en flama

En la Figura 36 se presenta a manera de ejemplo dos cromatogramas: el correspondiente a la solución estándar de GA3 y el cromatograma de la muestra comercial. Se puede observar claramente que el tiempo de retención del GA3 derivatizado en la solución de calibración coincide con el obtenido en la muestra del agroquímico; además este pico está separado hasta línea base de otras señales, confirmando que la matriz de muestra y el exceso del reactivo derivatizante no interfieren en la determinación. La cuantificación se realizó por el método de calibración externa, tomando el área del pico cromatográfico como señal analítica.

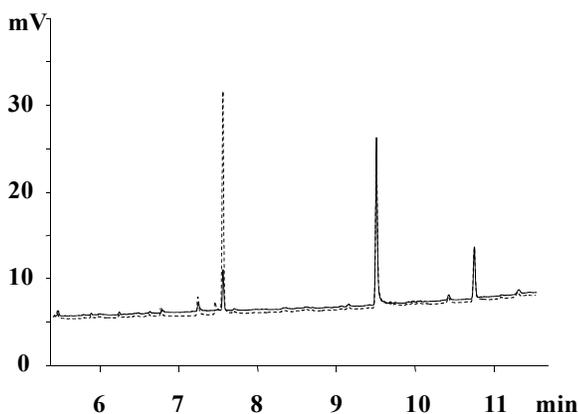


Figura 36 Cromatograma de la solución estándar de 0.5mg mL⁻¹ (•••) y la muestra Biogib (—)

Los principales parámetros analíticos evaluados en la etapa de calibración se presentan en la Tabla 15 y los resultados de cuantificación de cada una de las muestras de agroquímicos analizados se presentan en la Tabla 16. Al igual que en el análisis realizado por cromatografía de

líquidos el producto Gibgro se encuentra con una concentración mayor a lo presentado por el proveedor y que los demás están por debajo de lo especificado.

Tabla 15 Parámetros analíticos evaluados para la determinación del GA3 por GC-FID

Parámetro	Valor
Tiempo de retención \pm DE, min	7.47 \pm 0.05
Señal analítica (S)	Área del pico cromatográfico
Intervalo de calibración, $\mu\text{g/mL}$	5-1800
Ecuación de regresión lineal	S = 217638 x – 2695
R ²	0.9991
LD, $\mu\text{g/mL}$	0.91
LC, $\mu\text{g/mL}$	3.04
CV, % (0.1mg/mLGA3)	0.10
CV, % (05 mg/mLGA3)	0.04

Tabla 16 Cuantificación del GA3 en productos agroquímicos por GC-FID y los valores reportados por el proveedor. (n.d. No detectable)

Producto	resultado de este trabajo \pm DE, % (m/m)	Concentración indicada en el empaque, %, (m/m)
Gibgro	10.3 \pm 0.010	10
Activol	30.2 \pm 0.030	40
Biogib	3.16 \pm 0.003	10
Gibiotin 101	nd	8.2

nd – no detectado

Comparación de los resultados obtenidos por el micro procedimiento espectrofotométrico propuesto, por cromatografía de líquidos y de gases

Para facilitar la comparación de los alcances de los tres procedimientos, en la Tabla 17 se resumen los parámetros analíticos obtenidos (para el procedimiento espectrofotométrico se considera el uso de EI y los espectros derivados).

Tabla 17. Parámetros analíticos evaluados en los tres procedimientos

Parámetro	UV/Vis	HPLC-UV	GC-FID
Señal analítica, S	$^1D_{267.64nm}/^1D_{421.64nm}$	Área del pico cromatográfico	
Calibración, mg/mL	0.01 - 1.7	0.001-1.8	0.005-1.8
Ecuación de calibr.*	$S = 30.97x + 0.71$	$S = 2334 x - 2.54$	$S = 217638 x - 2695$
R ²	0.9998	0.9999	0.9991
LD, µg/mL	3.30	0.10	0.91
LC, µg/mL	11.0	0.34	3.04
CV, % (0.1mg/mLGA3)	0.40	0.03	0.10
CV, % (05 mg/mLGA3)	0.13	0.01	0.04

Como era de esperar, el procedimiento por cromatografía de líquidos ofrece el más bajo poder de detección y la mejor precisión de los resultados, Puesto que el análisis por cromatografía de gases requiere una derivatización previa del GA3, la precisión de este procedimiento fue peor. Por su parte, el procedimiento micro espectrofotométrico con el uso del EI ofrece condiciones comparables de la determinación de GA3 respecto procedimientos cromatográficos, sobre todo cuando el objetivo es la determinación de sus concentraciones relativamente altas en productos agroquímicos. El protocolo simple y no riguroso, ofrece la posibilidad de correr muchas muestras en corto tiempo y la factibilidad de implementación en laboratorios industriales son las ventajas importantes del procedimiento espectrofotométrico. En la Tabla 18 se resumen los resultados obtenidos en cuatro productos agroquímicos comerciales en todos procedimientos analíticos utilizados en este trabajo.

En primer lugar se observa muy buena concordancia entre los resultados de los dos procedimientos cromatográficos, Asimismo, para el producto Gibgro, los resultados son consistentes con el valor reportado por el fabricante. En el caso de productos Activol y Biogib, los valores obtenidos en este trabajo fueron más bajos que los reportados por los proveedores, mientras que en el Gibiotin 101 no se detectó el compuesto activo, lo que claramente indica la necesidad de llevar a cabo el control de calidad de los productos agroquímicos. Por otra parte, en el procedimiento micro espectrofotométrico el uso de espectros derivados y la cuantificación por el método de EI proporcionaron los resultados más acordes a los del HPLC y GC, afirmando que este procedimiento asegura buena exactitud de resultados en el análisis de GA3 en muestras industriales.

Tabla 18. Resultados del análisis de GA3 en los productos agroquímicos obtenidos utilizando diferentes procedimientos analíticos.

Señal analítica	Microprocedimiento UV/Vis				HPLC	GC
	$A_{254\text{nm}}$	$\frac{A_{254\text{nm}}}{A_{465\text{nm}}}$	$1D_{267.64\text{nm}}$	${}^1D_{267.64\text{nm}}/{}^1D_{421.64\text{nm}}$	Área del pico cromatográfico	
Gibgro10%	8.29 ±0.44	13.4 ±0.10	7.48 ±0.11	12.0 ±0.03	10.4 ± 0.01	10.3 ±0.01
Activol 40%	42.5 ±2.26	37.0 ±0.54	44.2 ±0.56	36.1 ±0.17	33.5 ±0.01	30.2 ±0.03
Biogib 10%	6.36 ±0.34	8.58 ±0.08	6.21 ±0.08	7.11 ±0.03	7.48 ±0.01	3.16 ±0.01
Gibiotin 101 8.2%	0.57 ±0.03	1.04 ±0.01	0.44 ±0.01	0.65 ±0.01	Nd	nd

IV.4.4. Conclusión

El procedimiento por espectrofotometría UV/Vis de primera derivada con mordiente azul I como estándar interno, permite la determinación del ácido gibberélico en los productos agroquímicos, proporcionando los resultados equiparables con los obtenidos utilizando las técnicas cromatográficas, por lo que puede ser utilizado en la determinación de este compuesto en muestras de interés industrial y de estudios biotecnológicos. Las ventajas del procedimiento propuesto son: escala micro, buenas características analíticas, protocolo simple y no riguroso.

IV.5. MARCAJE FLUORESCENTE DE AUXINAS CON BODIPYS Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

IV.5.1. Introducción

El análisis de las auxinas presenta una serie de dificultades debido a que estas se encuentran en plantas en bajas concentraciones y existe una gran variedad de interferentes; las técnicas analíticas utilizadas más frecuentemente han sido diferentes modalidades de cromatografía y electroforesis, así como diversas técnicas electroquímicas e inmunoensayos[148].

Los derivados de borodipirrometenos (BODIPY) poseen un núcleo estructural como el que se presenta en la Figura 37, esta estructura es muy versátil ya que durante su síntesis o posterior a ella se le pueden adicionar varios y/o distintos grupos funcionales, haciendo que estos puedan interactuar con un gran número de elementos o moléculas objetivo; además esta modificación permite que se tengan absorciones a diferentes longitudes de onda, así como varios colores de fluorescencia que van desde el verde hasta el infrarrojo cercano; otras de las características de estos compuestos que los llevan a tener un alto impacto durante su aplicación es su alta fotoestabilidad, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, grandes desplazamientos de Stokes, poca o nula toxicidad, rápida respuesta, estables en el rango de pH fisiológico, muy sensibles y selectivos; por lo que resultan ser sondas importantes para su aplicación en sistemas biológicos [149-153].

Las aplicaciones de estos compuestos pueden ser muy variadas, pueden servir como marcadores en la secuenciación del ADN del virus de inmunodeficiencia humana, sensores para cationes de metales pesados, sondas que presentan fluorescencia cuando se encuentran con ROS o RNS, colorantes del haz de laser, reconocimiento de péptidos que participan durante la enfermedad de Alzheimer [154-158]. Es por ello que en este trabajo se plantea el uso de los derivados de BODIPY como sondas fluorescentes para la cuantificación de auxinas en extractos de plantas que se encuentran bajo estrés abiótico.

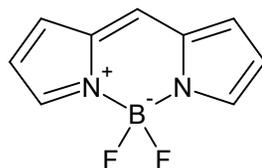


Figura 37 Estructura base de los borodipirrometenos (BODIPY)

IV.5.2. Objetivo

El objetivo ha sido explorar la factibilidad del marcaje de auxinas con derivados de BODIPY para su análisis por cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica.

IV.5.3. Parte experimental

Para la esterificación de las auxinas (ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético) con los BODIPYs se hizo reaccionar 20 μL de cada auxina de concentración 1.0 g L^{-1} con 40 μL de BODIPY de concentración 2.5 g L^{-1} , 40 μL de 4.5 g L^{-1} de dicitohexilcarbodiimida (DCC), 40 μL de 1.0 g L^{-1} de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) en CH_2Cl_2 seco.

En el análisis por HPLC se realizó la separación con una columna Gemini C-18 (150 x 3mm, 5 μm), con un flujo de 0.6 mL min^{-1} , a una temperatura de 40 $^\circ\text{C}$, un volumen de inyección de 10 μL , usando cuatro fases móviles: agua (A), acetonitrilo (B), 0.1% de ácido acético a pH 5 (ajustado con trietilamina) (C) y metanol (D) y el programa de gradiente: 0 min 15% B 30% C 15% D, 7 min 20% B 10% C 50% D manteniendo esta composición durante 9 min. Se utilizaron dos detectores en línea: detector de arreglo de diodos (DAD) y fluorimétrico (FLD).

El análisis del desplazamiento de Stokes se realizó mediante la inyección directa de la muestra al detector DAD para obtener su espectro de absorción para posteriormente seleccionar la longitud de onda en donde presentaban mayor absorbencia, a continuación se inyectaba de manera directa al detector FLD en donde se le indicaba la longitud de onda de excitación que correspondía a la de longitud de absorción antes seleccionada, se le indicaba al detector obtener el espectro de emisión para posteriormente seleccionar la longitud de máxima emisión, la diferencia entre estos valores proporcionó el desplazamiento base para cada compuesto.

Los derivados de BODIPYs se enviaron para la obtención de su masa molecular a la compañía Bruker Daltonics® en donde fueron analizados con un micrOTOF-Q II.

IV.5.4. Resultados y discusión

Las auxinas seleccionadas para el estudio fueron el ácido indolacético, indolbutírico y naftalenacético. No solamente estos compuestos han sido más estudiados en el pasado, sino que también representan típicas estructuras químicas de todo el grupo de auxinas.

8-(o-hidroximetilfenil) BODIPY

Se utilizó 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY como un posible marcador fluorescente. De esta manera, se esperaba que la reacción de marcaje ocurra mediante la esterificación entre grupo ácido de la auxina y el grupo hidroxilo del BODIPY (Figura 38). El compuesto BODIPY, presenta fluorescencia máxima en las condiciones: $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$ (Figura 39) y su análisis por espectrometría de masas presenta la señal del ion molecular correspondiente al BODIPY $[\text{M}-\text{H}]^-$, $m/z = 297.11$ (Figura 40). Puesto que la mínima diferencia entre longitudes de onda de excitación y emisión permitida en el detector fluorimétrico disponible son 25 nm, en el análisis cromatográfico las condiciones de detección fueron $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

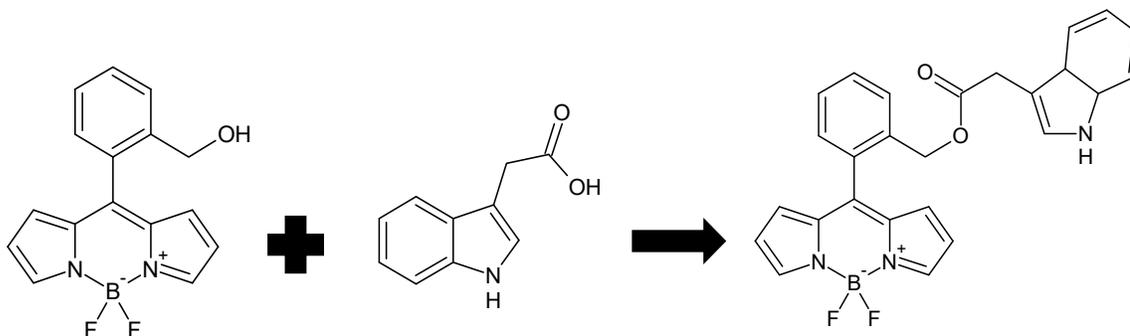


Figura 38 Reacción de esterificación entre el 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY y el ácido indolacético.

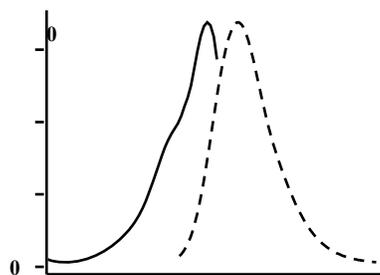


Figura 39 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY

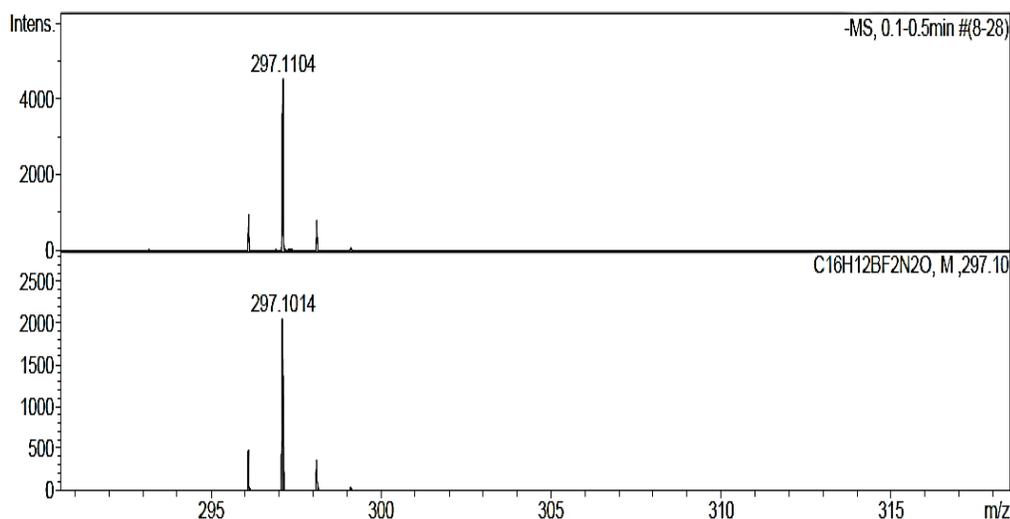


Figura 40 Espectro de masas del 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY utilizando la ionización por electronebulización en modo negativo. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.

En la Figura 41 se muestra el cromatograma de la mezcla de tres auxinas después de la reacción con el compuesto fluorescente, registrado con detector DAD y FLD, respectivamente. Con la detección espectrofotométrica (DAD, $\lambda = 495$ nm) se observa una buena separación de los tres compuestos; sin embargo con el detector fluorimétrico no se observó señales de los compuestos que contienen en su estructura el grupo indol. Para este experimento, se utilizó una mezcla de tres estándares de auxinas en concentraciones de 20 mg L^{-1} y un exceso molar del BODIPY. Para evaluar la factibilidad de la reacción de derivatización, se llevaron a cabo pruebas con cada una de las auxinas por separado, variando la relación entre auxina y BODIPY, sin embargo no se logró obtener un derivado fluorescente de los ácidos indólicos (Figura 42).

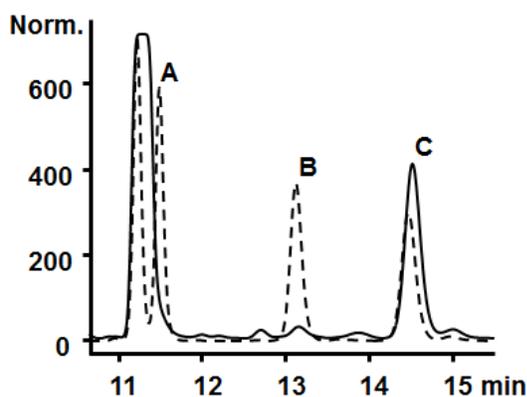


Figura 41 Cromatograma que presenta la reacción de A)Ácido indolacético, B)Ácido indolbutírico, C)Ácido naftalenacético a una concentración de 20mg L^{-1} con el 8-(*o*-hidroximetil fenil) BODIPY, en donde el eje X representa el tiempo y el eje Y muestra la normalización entre las señales de los detectores de arreglo de diodos a 495nm (---) y el fluorimétrico con $\text{Ex } 495$ y $\text{Em } 520\text{nm}$ (—).

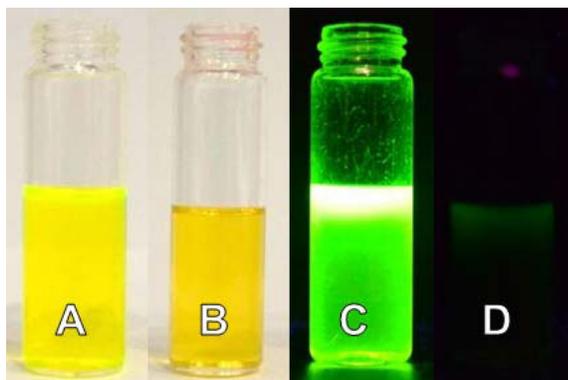


Figura 42 Fotografías bajo luz visible del A)8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY y del B)ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con $\lambda 365\text{ nm}$ C) y D) respectivamente.

2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY

Con base a los resultados anteriores, se utilizó un compuesto que presentaba cambios en las posiciones 2, 3, 5 y 6 en la estructura base del BODIPY, con el fin de modificar sus propiedades fluorescentes; en concreto lograr una mayor diferencia entre λ_{ex} y λ_{em} del derivado de cada una de las auxinas. Se utilizó el 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY (Figura 43), el cual después de ser analizado en espectrómetro de masas presentaba una señal que correspondía con el valor teórico reportado, $m/z=482.96$ (Figura 44). Desafortunadamente, para el segundo candidato del marcaje, el desplazamiento de Stokes fue también por debajo de los requerimientos del detector con $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 555\text{ nm}$ (Figura 45). Esto se observó analizando la mezcla después de reacción de esterificación con ácido indolacético encontrándose nuevamente la ausencia de fluorescencia(Figura 46).

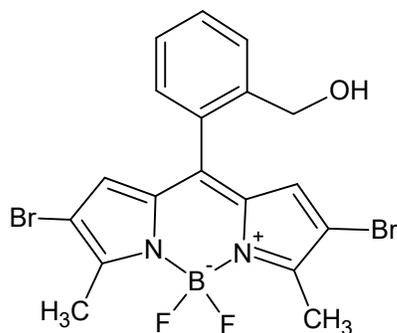


Figura 43 Estructura del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY

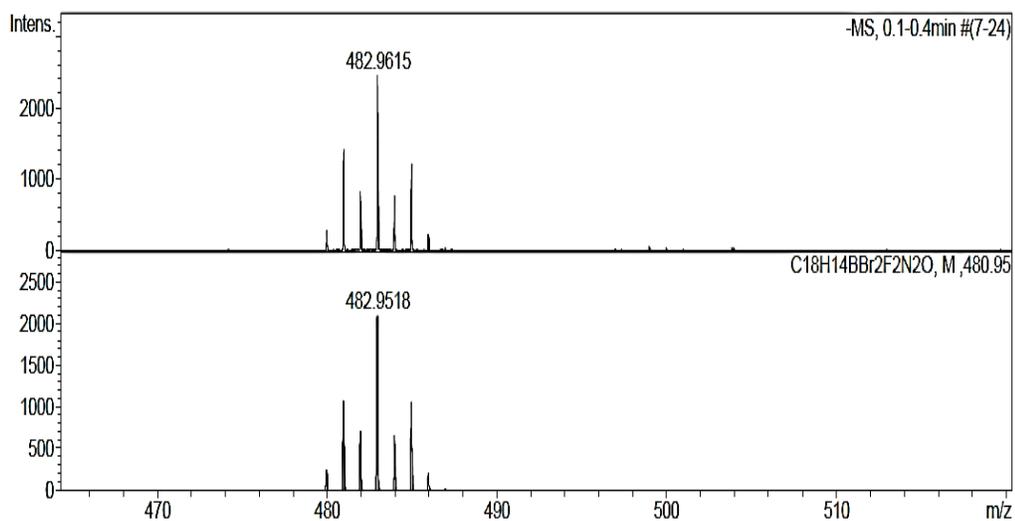


Figura 44 Espectro de masas del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY obtenido en ESI con lapolarización negativa. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.

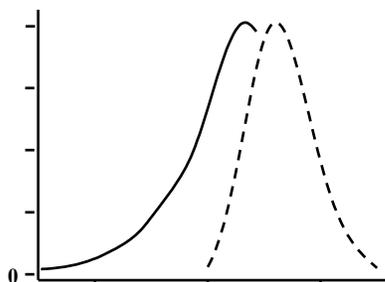


Figura 45 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY

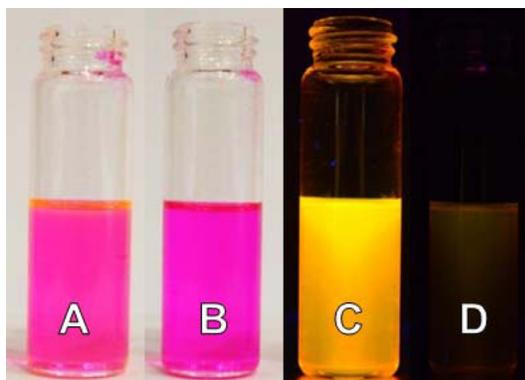


Figura 46 Fotografías bajo luz visible del A) del 2,6-dibromo-3,5-dimetil 8-(*o*-hidroximetilfenil) BODIPY y del B) ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con λ 365 nm C) y D) respectivamente.

8-(2-hidroxietoxi) BODIPY

Con el mismo fin de lograr la derivatización de auxinas formando compuestos fluorescentes, se procedió con otro derivado de BODIPY. En este caso se trabajó con un derivado que poseía una cadena alifática como un espaciador (Figura 47), esperando que la mayor distancia entre ambas entidades podría disminuir la influencia de las auxinas sobre la fluorescencia del propio BODIPY. De igual manera se llevó a cabo el análisis del nuevo BODIPY por espectrometría de masas del compuesto, confirmando su exitosa síntesis mediante la presencia de la señal del ion molecular, $m/z=251.08$, (Figura 48), El tercer compuesto presentó adecuadas propiedades fluorescentes con $\lambda_{ex} = 440$ nm y $\lambda_{em} = 490$ nm (Figura 49), sin embargo en la reacción de marcaje tampoco se logró la fluorescencia de derivados de auxinas (Figura 50). Con base en los resultados obtenidos en esta parte de trabajo y estudios encontrados en bibliografía, para el trabajo futuro se propone el uso de un espaciador de mayor tamaño para evitar pérdida de fluorescencia y obtener así una sonda adecuada para las auxinas.

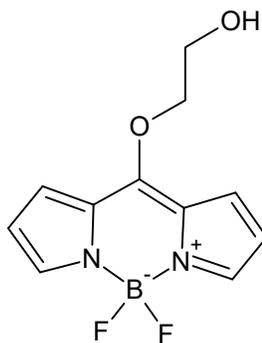


Figura 47 Estructura del 8-(2-hidroxietoxi) BODIPY

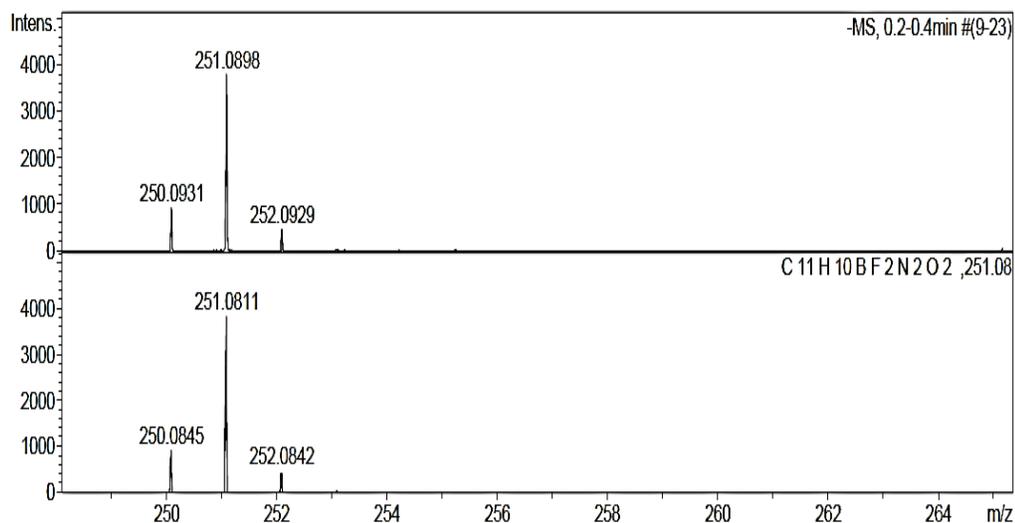


Figura 48 Espectro de masas del 8-(2-hidroxietoxi) BODIPY obtenido en la modalidad de lectura de aniones. En el eje X se presenta el rango de masas en el cual fue analizado el compuesto, mientras que en el eje Y se presenta la intensidad de las señales en cps.

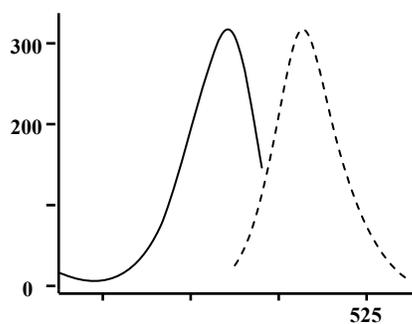


Figura 49 Espectros de excitación(—) y emisión(---) del del 8-(2-hidroxietoxi) BODIPY

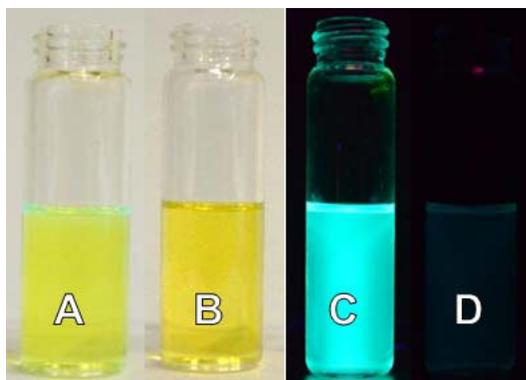


Figura 50 Fotografías bajo luz visible del A) del 8-(2-hidroxietoxi) BODIPY y del B) ester del BODIPY con el ácido indolacético, así como su exposición bajo luz UV con λ 365 nm C) y D) respectivamente.

IV.5.5. Conclusión

En esta parte de trabajo se intentó utilizar tres compuestos con la estructura base del BODIPY, a los que se introdujo diferentes estructuras conteniendo grupo hidroxilo terminal para el marcaje fluorescente de las auxinas mediante la reacción de esterificación. Entre las tres auxinas seleccionadas, se logró el marcaje del ácido naftalenacético pero para los ácidos indolacético e indolbutírico no se obtuvieron derivados fluorescentes. Para un posible trabajo futuro se propone llevar a cabo otra modificación del BODIPY, con un espaciador más largo por un lado y, por otro lado es necesario estudiar sistemáticamente y afinar las condiciones de reacción del marcaje.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo ha sido diseñado como un estudio analítico, centrado en el desarrollo de diferentes procedimientos que permitan detectar y cuantificar distintos compuestos relacionados con las plantas amenazadas por estrés ambiental. Se analizaron muestras biológicas e industriales de diferentes tipos, incluyendo las plantas de jitomate silvestre y las modificadas genéticamente para promover la resistencia ante patógenos; las plantas de tabaco silvestre y modificadas genéticamente para que sean resistentes a la toxicidad de P(III) y capaces de su asimilación/utilización, plantas de *L.sativum* crecidas en presencia de Cd(II) o Se(IV) como agentes estresantes y también los productos agroquímicos con ácido giberélico como principio activo.

Las técnicas analíticas utilizadas en el desarrollo del proyecto incluyeron las relativamente simples y accesibles en cualquier tipo de laboratorio (espectrofotometría UV/Vis, GC-FID) y también las técnicas más modernas y con mayores alcances en cuanto a la selectividad y sensibilidad (HPLC-DAD, HPLC-FLD, ICP-MS, HPLC-ICP-MS).

En la selección de los parámetros instrumentales y también en el análisis de datos obtenidos, se han utilizado las herramientas del análisis estadístico, incluyendo estadística descriptiva, análisis de correlación, algoritmo de optimización y el método de análisis de componentes principales (PCA).

Todos los procedimientos han sido validados, mediante la evaluación de típicos parámetros analíticos, mediante los experimentos de recuperación o comparando los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales con los resultados obtenidos para las mismas muestras pero mediante otros procedimientos, basados en diferente principio fisicoquímico.

Los resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto han sido reportados en dos artículos publicados en revistas indexadas, incluidas en Thompson Reuter Journal Citation Reports (ver anexo):

1. Julio Cesar Torres Elguera, Eunice Yanez Barrientos, Kazimierz Wrobel, Katarzyna Wrobel, “Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*”, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35, 431–441. **(IF 1.31)**
2. Julio César Torres Elguera, Eunice Yañez Barrientos, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel, “Monitoring of phosphorus oxide ion for analytical speciation of phosphite and phosphate in

transgenic plants by high-performance liquid chromatography-inductively coupled mass spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 6622-6628. **(IF 2.91)**

A continuación de manera resumida se presentan las principales conclusiones y contribución del trabajo realizado.

1. Se logró el desarrollo y aplicación de un procedimiento para la determinación de 29 compuestos fenólicos de interés en el análisis de plantas, mediante su derivatización pre-columna con BSTFA-TMCS y el análisis por GC-FID. Entre las características que este método presenta son: buena resolución cromatográfica prácticamente de los compuestos fenólicos, así como un rango para estos compuestos que van desde 6 a 42 mg g⁻¹ de biomasa liofilizada.
2. Se llevó a cabo la aplicación del procedimiento, previamente desarrollado, en el análisis de cultivos de *L. sativum*, crecidos hidropónicamente a diferentes concentraciones de los iones Cd(II) y Se(IV), este estudio aportó nuevas evidencias sobre el impacto del estrés abiótico impuesto por estresantes individuales y sus mezclas en esta especie de planta. El análisis de estas muestras mostró diferencias en el perfil de compuestos fenólicos, siendo el efecto más notorio para las muestras que contenían Cd(II) respecto a las de Se(IV) y a las mezclas de los dos iones; la capacidad antioxidante, en las muestras ya mencionadas, fue mayor respecto a las plantas control en la fracción de fenólicos solubles totales. Estos resultados aluden a que el cadmio, al imponer estrés oxidativo, activa la respuesta de la planta en términos de la incorporación de fenólicos libres en precursores de los ligninos para fortalecimiento de la pared celular y en términos del daño oxidativo directo, mientras que el selenio (Se(IV)) agregado al medio en bajas concentraciones (< 1.5 mg L⁻¹) aparentemente estimula la síntesis de compuestos fenólicos.
3. Se desarrolló un novedoso procedimiento que permite la especiación química de fosfito y fosfato aplicando cromatografía de intercambio iónico con detección específica de fósforo (como PO⁺) por ICP-MS. Se favoreció la formación de iones de óxido de fósforo en el plasma mediante la adición de ácido nítrico a la fase móvil y el ajuste de las condiciones de operación del ICP-MS. El monitoreo del ion óxido de fósforo presentó límites de detección más bajos, mejor precisión y exactitud, respecto al monitoreo del ion elemental. El procedimiento fue utilizado en el análisis de los extractos de plantas transgénicas capaces de metabolizar fosfito; se demostró su confiabilidad mediante los experimentos de recuperación además de la concordancia de resultados obtenidos con los reportados previamente en muestras similares.

4. Para la determinación del ácido giberélico en productos agroquímicos, se desarrolló un procedimiento por espectrofotometría UV/Vis de primera derivada con mordiente azul I como estándar interno, que tiene como ventajas: escala micro, buena exactitud y precisión, protocolo simple y no riguroso. Este procedimiento presentó resultados equiparables con los obtenidos utilizando las técnicas cromatográficas, lo cual permite su aplicación en muestras de interés industrial y de estudios biotecnológicos.
5. Se examinó la factibilidad del uso de los compuestos BODIPY para el marcaje molecular de tres fitohormonas del grupo de auxinas. Para verificar posible formación de derivados fluorescentes, las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC-DAD/FLD. A pesar de las modificaciones de las estructuras de los BODIPYs (realizado en el laboratorio del Dr. Eduardo Peña Cabrera), solamente se logró el marcaje del ácido naftalenacético. Estos resultados son prometedores y en un posible estudio futuro es necesario estudiar sistemáticamente las condiciones de reacción así como emplear las herramientas de espectrometría de masas.

En resumen, el desarrollo y aplicación de los distintos procedimientos analíticos en este trabajo, ha permitido avanzar en el conocimiento acerca de los cambios que sufren las plantas cuando son sometidas a situaciones de estrés o cuando están modificadas genéticamente para lograr su mayor resistencia al estrés..

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

1. Kim, D.H. and S. Sung, *Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization*. Arabidopsis Book, 2014. **12**: p. e0171.
2. Klie, S., et al., *Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species*. Plant Physiol, 2014. **164**(1): p. 55-68.
3. Deborde, C. and D. Jacob, *MeRy-B, a metabolomic database and knowledge base for exploring plant primary metabolism*. Methods Mol Biol, 2014. **1083**: p. 3-16.
4. Cavalier-Smith, T., *Origins of secondary metabolism*. Ciba Found Symp, 1992. **171**: p. 64-80; discussion 80-7.
5. Avalos García, A. and E. Perez-Urria Carril, *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología), 2009. **Serie Fisiologica Vegetal**(2,(3)): p. 119-145.
6. Hogenhout, S.A., et al., *Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009. **22**: p. 115-122.
7. 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.
8. Schat, H., et al., *The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes*. J Exp Bot, 2002. **53**(379): p. 2381-92.
9. Colpaert, J. and J. Assche, *Zinc toxicity in ectomycorrhizal Pinus sylvestris*. Plant and Soil, 1992. **143**: p. 201-211.
10. Jing, H. and D.D. Kitts, *Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(7): p. 1007-15.
11. Lasat, M.M., *Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms*. J. Environ. Qual., 2002. **31**: p. 109-120.
12. Bringezu, K., et al., *Heavy metal tolerance of Silene vulgaris*. Journal of Plant Physiology, 1999. **154**: p. 536-546.
13. 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.
14. Pogany, M., et al., *Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants*. Acta Phytopathol Entom Hung, 2006. **41**: p. 23-35.
15. Jeffers, P., et al., *Generation of reactive oxygen and antioxidant species by hydrodynamically stressed suspensions of Morinda citrifolia*. Biotechnol Prog, 2007. **23**(1): p. 138-45.
16. Kuzniak, E. and H. Urbanek, *The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses*. Acta Physiol Plant, 2000. **22**: p. 195-203.
17. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu Rev Plant Biol, 2004. **55**: p. 373-99.
18. Taran, N.Y., et al., *Secondary oxidative stress as an element of general adaptive response to unfavorable environmental factors*. Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii, 2004. **36**: p. 3-14.
19. Mandal, S. and A. Mitra, *Reinforcement of cell wall in roots of Lycopersicon esculentum through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors*. Physiol Mol Plant Pathol, 2007. **71**: p. 201-209.
20. Mandal, S., A. Mitra, and N. Mallick, *Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between Solanum lycopersicum and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Physiol Mol Plant Pathol, 2008. **72**: p. 56-61.

21. Nouari, I., et al., *Changes in content and fatty acid profiles of total lipids of two halophytes: Sesuvium portuacastrum and Mesembryanthemum crystallinum under cadmium stress*. J Plant Physiol, 2008. **163**: p. 1198-1202.
22. Filek, M., et al., *The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress*. J Plant Physiol, 2008. **165**: p. 833-844.
23. Mithofer, A., B. Schulze, and W. Boland, *Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 1-5.
24. Kavitha, R. and S. Umesha, *Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato*. Phytoparasitica, 2008. **36**: p. 144-159.
25. Grace, S.C., *Phenolics as antioxidants*. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, 2005: p. 141-168.
26. Janas, K.M., et al., *Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation*. Plant Physiol Biochem, 2000. **38**: p. 587-593.
27. Vasyukova, N.I. and O.L. Ozeretskoykaya, *Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues*. Russ J Plant Physiol, 2009. **56**: p. 581-590.
28. Lopez-Gresa, M.P., et al., *Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions*. Phytochem Anal, 2010. **21**: p. 89-94.
29. Grace, S.C., *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, in *Phenolics as antioxidants*, N. Smirnoff, Editor. 2005. p. 141-168.
30. Chakraborty, D. and S.M. Mandal, *Fractional changes in phenolic acids composition in root nodules of Arachis hypogaea L.* Plant Growth Regul, 2008. **55**: p. 159-163.
31. Mandal, S., A. Mitra, and N. Mallick, *Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activities of defense enzymes in tomato roots in relation to Fusarium wilt*. World J Microb Biot, 2009. **25**: p. 795-802.
32. Moller, I.M., P.E. Jensen, and A. Hansson, *Oxidative modifications to cellular components in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2007. **58**: p. 459-81.
33. Dey, G., M. Chakraborty, and A. Mitra, *Profiling C6-C3 and C6-C1 phenolic metabolites in Cocos nucifera*. J Plant Physiol, 2005. **162**(4): p. 375-81.
34. Cle, C., et al., *Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in Solanum lycopersicum; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance*. Phytochemistry, 2008. **69**(11): p. 2149-56.
35. Boudet, A.M., *Evolution and current status of research in phenolic compounds*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2722-35.
36. 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.
37. Chakraborty, D. and S.M. Mandal, *Fractional changes in phenolic acids composition in root nodules of Arachis hypogaea L.* Plant Growth Regul, 2008. **55**(3): p. 159-163.
38. 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.
39. Mandal, S. and A. Mitra, *Accumulation of cell wall-bound phenolic metabolites and their upliftment in hairy root cultures of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Biotechnol Lett, 2008. **30**(7): p. 1253-8.
40. Ferreres, F., et al., *Screening of antioxidant phenolic compounds produced by in vitro shoots of Brassica oleracea L. var. costata DC*. Comb Chem High Throughput Screen, 2009. **12**(3): p. 230-40.
41. Dai, J. and R.J. Mumper, *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules, 2010. **15**(10): p. 7313-52.

42. Arimboor, R., K.S. Kumar, and C. Arumughan, *Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) using RP-HPLC with DAD*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **47**(1): p. 31-38.
43. Ziaková, A. and E. Brandsřeterova, *Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some Lamiaceae Family Plants*. J Liq Chrom Relat Tech, 2003. **26**(3): p. 443-453.
44. Öztürka, N., M. Tunçelb, and N. Tunçelc, *Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials*. J Liq Chrom Relat Tech, 2007. **30**(4): p. 587-596.
45. Cohen, S.D. and J.A. Kennedy, *Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2010. **50**(7): p. 620-43.
46. Atkinson, N.J., et al., *Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (Solanum lycopersicum)*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(17): p. 9673-82.
47. Sivaci, A., E.R. Sivaci, and R. Sokmen, *Changes in antioxidant activity, totalphenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants Myriophyllum spicatum L. and Myriophyllum triphyllum orchard exposed to cadmium*. Ecotoxicology, 2007. **16**(5): p. 423-428.
48. Kovacik, J. and B. Klejdus, *Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated Matricaria chamomilla roots*. Plant Cell Rep, 2008. **27**(3): p. 605-15.
49. Kovacik, J., M. Backor, and J. Kadukova, *Physiological responses of Matricaria chamomilla to cadmium and copper excess*. Environ Toxicol, 2008. **23**(1): p. 123-30.
50. Kovacik, J., et al., *Cadmium and nickel uptake are differentially modulated by salicylic acid in Matricaria chamomilla plants*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(20): p. 9848-55.
51. Sgherri, C., E. Cosi, and F. Navari-Izzo, *Phenols and antioxidative status of Raphanus sativus grown in copper excess*. Physiol Plant, 2003. **118**(1): p. 21-28.
52. Babar, A.M., et al., *Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of Panax ginseng in response to copper stress*. Plant Sci, 2006. **171**(1): p. 147-154.
53. Kovacik, J., B. Klejdus, and M. Backor, *Phenolic metabolism of Matricaria chamomilla plants exposed to nickel*. J Plant Physiol, 2009. **166**: p. 1460—1464.
54. Gratao, P.L., et al., *Plant antioxidant responses to toxic elements*. Curr Top Biochem Res, 2006. **8**(1&2): p. 41-70.
55. Michalak, A., *Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress*. Pol J Environ Stud, 2006. **15**(4): p. 523-530.
56. Kovacik, J., et al., *Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of Matricaria chamomilla plants*. Ecotoxicology, 2009. **18**: p. 544-554.
57. Kovacik, J., et al., *Lignification and related parameters in copper-exposed Matricaria chamomilla roots: role of H₂O₂ and NO in this process*. Plant Sci, 2010. **179**: p. 383-389.
58. Kovacik, J., et al., *Significance of phenols in cadmium and nickel uptake*. J Plant Physiol, 2011. **168**: p. 576-584.
59. Fang, Z., et al., *Phosphate signaling in Arabidopsis and Oryza sativa*. Plant Science, 2009. **176**(1): p. 170-80.
60. Chien, S., et al., *Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review*. Nutr Cycl Agroecosys, 2011. **89**: p. 229-255.
61. Thao, H.T.B. and T. Yamakawa, *Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator?*. Soil Sci Plant Nutr, 2009. **55**: p. 228-234.

62. Avila, F.W., et al., *Phosphite supply affects phosphorus nutrition and biochemical response in maize plants*. Austral J Crop Sci, 2011. **5**: p. 646-653.
63. Ratjen, A.M. and J. Gerendas, *A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus*. J Plant Nutr Soil Sci, 2009. **172**: p. 821-828.
64. Lopez-Arredondo, D.L. and L. Herrera-Estrella, *Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system*. Nature Biotechnol, 2012. **30**: p. 889-893.
65. Lopez-Arredondo, D.L. and L. Herrera-Estrella, *Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(9): p. 889-93.
66. Danova-Alt, R., et al., *Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells - kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies*. Plant Cell Environ, 2008. **31**: p. 1510-1521.
67. Berkowitz, O., et al., *An enzymatic fluorescent assay for the quantification of phosphite in a microtiter plate format*. Anal Biochem, 2011. **412**: p. 74-78.
68. Roos, G.H.P., C. Loane, and B. Dell, *Facile high performance ion chromatographic analysis of phosphite and phosphate in plant samples*. Commun Soil Sci Plant Anal, 1999. **301**: p. 2323-2329.
69. Smillie, R.H. and B. Grant, *Determination of phosphate and phosphite in plant material by gas chromatography-mass spectrometry and ion chromatography*. J Chromatogr, 1988. **455** p. 253-261.
70. Thao, H.T.B., et al., *Growth response of komatsuna (Brassica rapa var. peruviridis) to root and foliar applications of phosphite*. Plant and Soil, 2008. **308**: p. 1-10.
71. de Sa, M., et al., *A liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of salicylic, jasmonic and abscisic acids in Coffea arabica leaves*. J Sci Food Agric, 2013.
72. Liu, D., et al., *Rice Suspension Cultured Cells are Evaluated as a Model System to Study Salt Responsive Networks in Plants using a Combined Proteomic and Metabolomic Profiling approach*. Proteomics, 2013.
73. Wang, Y.H. and H.R. Irving, *Developing a model of plant hormone interactions*. Plant Signal Behav, 2011. **6**(4): p. 494-500.
74. Kazan, K., *Auxin and the integration of environmental signals into plant root development*. Ann Bot, 2013.
75. Sauer, M., S. Robert, and J. Kleine-Vehn, *Auxin: simply complicated*. J Exp Bot, 2013.
76. Bottini, R., et al., *Identification of Gibberellins A(1), A(5), A(29), and A(32) from Immature Seeds of Apricot (Prunus armeniaca L.)*. Plant Physiol, 1985. **78**(2): p. 417-9.
77. Lovegrove, A.B., D. H. P.; Beale, M. H.; Hooley, R. , *Gibberellin-photoaffinitylabelling of two polypeptides in plant plasma membranes*. . Plant J. , 1998. **15**: p. 311-320.
78. O'Neill, D.P.R., J. J.; Reid, J. B., *Changes in gibberellin A1 levels and response during de-etiolation of pea seedlings*. . Plant Physiol. , 2000. **124**: p. 805-812.
79. Ou-Lee, T.M.T., R.; Wu, R., *Interaction of a gibberellin induced factor with the upstream region of ana-amylase gene in rice aleurone tissue*. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988. **85**: p. 6366-6369.
80. Peng, J.R., D. E.; Hartley, N. M.; Murphy, G. P.; Flintham, J. E.; Beales, J.; Fish, L. J.; Pelica, F.; Sudhakar, D.; Christou, P.; Snape, J. W.; Gale, M. D.; Harberd, N. P. , *'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators*. . Nature, 1999. **400**: p. 256-261.

81. Pensen, S.P.S., R. C.; Fath, A.; Gubler, F.; Jacobsen, J. V.; Jones, R. L., *cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone*. Plant Cell 1996. **8**: p. 2325-2333.
82. Phinney, B.O., *The history of gibberellins*. In *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*. A. Crozier (ed.), Praeger, New York, 1983: p. 15-52.
83. Naczk, M. and F. Shahidi, *Extraction and analysis of phenolics in food*. J Chromatogr A, 2004. **1054**(1-2): p. 95-111.
84. Ma, Y.Q., et al., *Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound*. Ultrason Sonochem, 2009. **16**(1): p. 57-62.
85. Fiamegos, Y., et al., *Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1041**: p. 11–18.
86. Moco, S., et al., *Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit*. J Exp Bot, 2007. **58**(15-16): p. 4131-46.
87. Arimboor, R., K. Sarin Kumar, and C. Arumughan, *Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides) using RP-HPLC with DAD*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **47**: p. 31-38.
88. Kitin, P., et al., *Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy*. Plant Physiol. **154**(2): p. 887-98.
89. Fiamegos, Y.C., et al., *Analytical procedure for the in-vial derivatization--extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection*. J Chromatogr A, 2004. **1041**(1-2): p. 11-18.
90. Zadernowski, R., S. Czaplicki, and M. Naczk, *Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana)*. Food Chem, 2009. **112**(3): p. 685-689.
91. Blau, K. and J. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 1996.
92. 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, in press
93. 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.
94. Minuti, L., R.M. Pellegrino, and I. Tesei, *Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine*. J Chromatogr A, 2006. **1114**(2): p. 263-8.
95. Yhung, M., B. Sun, and J. Young, *Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids in white and red Korean ginsengs (Panax ginseng C.A. Meyer)*. Food Chemistry, 2002. **79**: p. 105-111.
96. Mandal, S. and A. Mitra, *Accumulation of cell wall-bound phenolic metabolites and their upliftment in hairy root cultures of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Biotechnol Lett, 2008. **30**: p. 1253-8.
97. Mandal, S., A. Mitra, and N. Mallick, *Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activates of defense enzymes in tomato roots in relation to Fusarium wilt*. World J Microb Biot, 2009. **25**: p. 795-802.
98. Pérez, J. and F. Saura, *Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays*. Food Research International, 2006. **39**: p. 791-801.

99. Cecchi, A., et al., *Sorption-desorption of phenolic acids as affected by soil properties*. Biol Fertil Soils, 2004. **39**: p. 235-242.
100. Caniova, A. and E. Brandsteterova, *HPLC Analysis of phenolic acids in Melissa officinalis*. J Liq Chrom Relat Tech, 2001. **24**(17): p. 2647-2659.
101. Srinivasa Rao, K., P.K. Chaudhury, and A. Pradhan, *Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of Chromolaena odorata*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(2): p. 729-32.
102. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agr Food Chem, 2005. **53**: p. 1841-1856.
103. Zagoskina, N.V., E.A. Goncharuk, and A.K. Alyavina, *Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant*. Russ J Plant Physiol, 2007. **54**(2): p. 237-243.
104. Kovacic, J., M. Backor, and J. Kadukova, *Physiological responses of Matricaria chamomilla to cadmium and copper excess*. Environ Toxicol, 2008. **23**(1): p. 123-130.
105. Ramos, S.J., et al., *Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite*. Plant Soil Environ, 2010. **56**(12): p. 584-588.
106. Poldma, P., et al., *Effect of selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (Allium sativum L.)*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(10): p. 5498-5503.
107. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**: p. 1231-1237.
108. Arnao, M.B., A. Cano, and M. Acosta, *Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion*. Free Radic Res, 1999. **31**: p. 89-96.
109. Vallverdu-Queratl, A., et al., *Changes in phenolic content of tomato products during storage*. J Agr Food Chem, 2011. **59**: p. 9358-9365.
110. Pellegrini, N., et al., *Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some puer compounds and beverages*. J Agr Food Chem, 2003. **51**: p. 260-264.
111. Nenandis, N., et al., *Estimation of scevening activity of phenolic compounds using ABTS assay*. J Agr Food Chem, 2004. **52**: p. 4669-4674.
112. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic Biol Med, 1996. **7**: p. 933-956.
113. Campbell, M.M. and r.R. Sederoff, *Variation in lignin content and composition. Mechanism of control and implications for the genetic improvement of plants*. Plant Physiol, 1996. **110**: p. 3-13.
114. Meyer, M.W., J.S. Lupoi, and E.A. Smith, *1064 nm dispersive multichannel Raman spectroscopy for the analysis of plant lignin*. Anal Chim Acta, 2011. **706**(1): p. 164-170.
115. Machinet, G.E., et al., *Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes*. soil Biol & Biochem, 2011. **43**(7): p. 1544-1552.
116. Brett, P., L. Barron, and P. Nesterenko, *The determination of phosphates in environmental samples by ion chromatography*. Chromatographic Science Series, 2006. **93 (Chromatographic Analysis of the Environment, Third Ed.)**: p. 263-286.
117. Schroetter, S., et al., *Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (Zea mays)*. Landbauforschung Voelkenrode 2006. **56**: p. 87-99.
118. Noack, S.R., et al., *Crop residue phosphorus: speciation and potential bio-availability*. Plant Soil, 2012. **359**: p. 375-385.

119. Han, C., et al., *Determination of phosphite in a eutrophic freshwater lake by suppressed conductivity ion chromatography*. Environ Sci Technol, 2012. **46**: p. 10667–10674.
120. Ivey, M.M. and K.L. Foster, *Detection of phosphorus oxyanions in synthetic geothermal water using ion chromatography–mass spectrometry techniques*. J Chromatogr A, 2005. **1098**: p. 95–103.
121. Pilbeam, R.A., et al., *Phosphite concentration: its effect on phytotoxicity symptoms and colonisation by *Phytophthora cinnamomi* in three understorey species of *Eucalyptus marginata* forest*. Australasian Plant Pathol, 2000. **29**: p. 86-95.
122. Sadi, B.B., A.P. Vonderheide, and J.A. Caruso, *Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell*. J Chromatogr A, 2004. **1050**(1): p. 95-101.
123. Chen, Z., et al., *Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system*. Talanta, 2009. **78**: p. 852-856.
124. Guo, Z.X., Q. Cai, and Z.G. Yang, *Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection*. J Chromatogr A, 2005. **1100**: p. 160–167.
125. Valls-Cantenys, C., et al., *Speciation of phosphorus oxoacids in natural and waste water samples*. J Chromatogr A, 2012. **1231**: p. 16-21.
126. Shah, M. and J.A. Caruso, *Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: Recent trends in phosphorus speciation*. J Sep Sci, 2005. **28**: p. 1969-1984.
127. 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.
128. Smith, C.J., et al., *Enhanced detection of sulphur and phosphorus containing compounds in HPLC-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry using chemical resolution via hexapole-based reaction with oxygen*. Chromatographia, 2004. **59**: p. S165-S170.
129. Diez, F., S., et al., *Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics*. Anal Chem, 2012. **84**: p. 5851-5857.
130. Persson, D.P., et al., *Simultaneous iron, zinc, sulfur and phosphorus speciation analysis of barley grain tissues using SEC-ICP-MS and IP-ICP-MS*. Metallomics, 2009. **1**: p. 418-426.
131. Civardelli, D., et al., *Protein phosphorylation stoichiometry by simultaneous ICP-QMS determination of phosphorus and sulfur oxide ions: A multivariate optimization of plasma operating conditions*. Talanta, 2010. **80**: p. 1513-1525.
132. Kovacevic, M., et al., *Matrix effects during phosphorus determination with quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2005. **383**: p. 145-151.
133. Alcazar, A., et al., *Ion chromatographic determination of some organic acids, chloride and phosphate in coffee and tea*. Talanta, 2003. **61**: p. 95-101.
134. Sunil, R.P., et al., *A validated stability indicating ion exchange method for the quantification of alendronate, phosphite and phosphate in alendronate sodium tablets and analysis of in-vitro dissolution samples* J Chilen Chem Soc, 2012. **57**: p. 1232-1236.
135. Hanrahan, G., et al., *Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: significance, speciation and determination*. Talanta, 2005. **66**: p. 435-444.

136. Camp, C.L., et al., *Analysis of mono-phosphate nucleotides as a potential method for quantification of DNA using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**: p. 367-372.
137. Munoz, J.A., M. Lopez-Mesas, and M. Valiente, *Minimum handling method for the analysis of phosphorus inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) in urine by SPE-ICP techniques*. Anal Chim Acta, 2010. **658**: p. 204-208.
138. Cade-Menun, B.J. and C.M. Preston, *A comparison of soil extraction procedures for P-31 NMR spectroscopy*. Soil Sci, 1996. **161**: p. 770-785.
139. Ahmed, B. and A. Islam, *Use of sodium EDTA as an extractant for determining available phosphate in soil*. Geoderma, 1975. **14**: p. 261-265.
140. Demaria, P., et al., *Exchangeability of phosphate extracted by four chemical methods*. J Plant Nutr Sci, 2005. **168**: p. 89-93.
141. Malonek, S.B., S.; Bornberg-Bauer, E.; Rojas, M. C.; Hedden, P.; Hopkins, P.; Tudzynski, B., *Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the Gibberella fujikuroi species complex*. Phytochemistry 2005. **66**: p. 1296-1311.
142. Hedden, P., et al., *Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution?* J Plant Growth Regul, 2001. **20**(4): p. 319-331.
143. Holbrook, A.A., W.J.W. Edge, and E.F. Baily, *Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid*. Adv Chem Series, 1961. **28**: p. 159-167.
144. Tomasini, A.F., C.; Barrios-Gonzalez, J., *Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems*. World J Microbiol Biotechnol, 1997. **13**: p. 203-206.
145. Nava Saucedo, J.E.B., J. N.; Thomas, D. , *Continuous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of Gibberella fujikuroi in calcium alginate beads*. . Appl Microbiol Biotechnol 1989. **30**: p. 226-233.
146. Gelmi, C.P.-C., R.; Agosin, E.; Gonzalez, M.; Agosin, E., *Solid substrate cultivation of Gibberella fujikuroi on an inert support*. . Proc Biochem, 2000. **35**: p. 1227-1233.
147. Berrios, J., A. Illanes, and G. Aroca, *Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths*. Biotechnol Lett, 2004. **26**: p. 67-70.
148. Hu, Y., et al., *Development of sample preparation method for auxin analysis in plants by vacuum microwave-assisted extraction combined with molecularly imprinted clean-up procedure*. Anal Bioanal Chem, 2011. **399**(10): p. 3367-74.
149. Hu, R., et al., *Synthesis, solvatochromism, aggregation-induced emission and cell imaging of tetraphenylethene-containing BODIPY derivatives with large Stokes shifts*. Chem Commun (Camb), 2012. **48**(81): p. 10099-101.
150. Alford, R., et al., *Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review*. Mol Imaging, 2009. **8**(6): p. 341-54.
151. Lager, E., et al., *Novel meso-polyarylamine-BODIPY hybrids: synthesis and study of their optical properties*. J Org Chem, 2009. **74**(5): p. 2053-8.
152. Osorio-Martinez, C.A., et al., *8-AminoBODIPYs: cyanines or hemicyanines? The effect of the coplanarity of the amino group on their optical properties*. J Org Chem, 2012. **77**(12): p. 5434-8.
153. Flores-Rizo, J.O., et al., *8-Alkoxy- and 8-aryloxy-BODIPYs: straightforward fluorescent tagging of alcohols and phenols*. J Org Chem, 2013. **78**(12): p. 5867-77.
154. Metzker, M.L., et al., *Quantitation of mixed-base populations of HIV-1 variants by automated DNA sequencing with BODIPY dye-labeled primers*. Biotechniques, 1998. **25**(3): p. 446-7, 450-2, 454, passim.
155. Zhang, Y., et al., *An SPE-assisted BODIPY fluorometric paper sensor for the highly selective and sensitive determination of Cd in complex sample: rice*. Analyst, 2014.

156. Xu, J., et al., *A water-soluble BODIPY derivative as a highly selective "Turn-On" fluorescent sensor for H₂O₂ sensing in vivo*. Biosens Bioelectron, 2014. **56**: p. 58-63.
157. Gomez-Duran, C.F., et al., *8-PropargylaminoBODIPY: unprecedented blue-emitting pyrromethene dye. Synthesis, photophysics and laser properties*. Chem Commun (Camb), 2010. **46**(28): p. 5103-5.
158. Roacho, R.I., et al., *8-Amino-BODIPYs: structural variation, solvent-dependent emission, and VT NMR spectroscopic properties of 8-R₂N-BODIPY*. J Org Chem, 2013. **78**(9): p. 4245-50.

ANEXO

Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*

Julio Cesar Torres Elguera · Eunice Yañez Barrientos · Kazimierz Wrobel · Katarzyna Wrobel

Received: 16 April 2012 / Revised: 29 July 2012 / Accepted: 24 August 2012 / Published online: 9 September 2012
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2012

Abstract The purpose of this study was to investigate the effects of cadmium [Cd(II) as cadmium chloride], selenium [Se(IV) as sodium selenite] and their mixtures on phenolic compounds (PCs) and antioxidant activity (AOx) in *Lepidium sativum*. The biomass fractions corresponding to free (F1), soluble glycoside-bound (F2) and cell wall ester-bound phenolics (F3) were obtained for each treatment and PCs were screened by gas chromatography (GC-FID); F1 and F2 fractions were also analyzed by liquid chromatography with UV and fluorimetric detection. The treated plants presented different profiles of PCs as compared to controls, specifically in F1 and F2 fractions; the plant response was element-, and concentration-dependent. The cultures challenged with Cd(II) up to 5 mg L^{-1} , presented higher AOx with respect to controls, and this increase was associated with glycoside-bound PCs, whereas for Se(IV) the increase of AOx was less marked and associated with free PCs. Under simultaneous exposure to Cd(II) + Se(IV) ($0.5\text{--}2.0 \text{ mg L}^{-1}$ each), the AOx values were relatively constant and lower than those found in the presence of Se(IV) or Cd(II) alone, providing further evidence of the protective role of Se(IV) against stress imposed by Cd(II) in this plant species. The evaluation of AOx of individual PCs and the results of principal component analysis enabled to attain several relationships among exposure conditions, antioxidant activity, free- and glycoside-bound phenolic compounds.

Keywords *Lepidium sativum* · Garden cress · Selenium · Cadmium · Phenolic compounds · Antioxidant activity

Introduction

Phenolic compounds (PCs) are important plant constituents that are required for the synthesis of lignin and pigments, they also provide structural integrity and scaffolding support to plants. In higher plants, these compounds are considered as secondary metabolites that, among others, are implicated in the plant defense-related machinery (Boudet 2007; Gill and Tuteja 2010). Health promoting antioxidant, antimicrobial and antitumor properties of PCs contained in edible plants enhance their nutritional quality (Michalak 2006; Ferreres et al. 2009; Dai and Mumper 2010; Khadem and Marles 2010). It has been reported that abiotic stress results in the increased production of phenolic compounds (Kovacik et al. 2008; Dutta and Maharia 2012) and appropriate management of exposure conditions may stimulate PCs metabolism (Cohen and Kennedy 2010; Yuan et al. 2010; Atkinson et al. 2011). In this regard, foliar application of selenium to garlic grown in the open field resulted in the increased antioxidant capacity of bulbs (Poldma et al. 2011). On the other hand, the impact of plant exposure to heavy metals such as Cd, Cu, Ni and Zn on the profile of phenolic compounds and related antioxidant activity has been studied (Sivaci et al. 2007; Kovacik et al. 2008, 2009a; Kovacik and Klejdus 2008). The plant response varied depending on the kind of element (Sgherri et al. 2003; Babar et al. 2006; Kovacik and Klejdus 2008; Kovacik et al. 2009b) and tended to be potentiated in the presence of heavy metal mixtures (Gratao et al. 2006; Michalak 2006). The heavy metal-activated regulation of phenolic metabolism has been studied and the results

Communicated by J. V. Jorriñ-Novo.

J. C. T. Elguera · E. Y. Barrientos · K. Wrobel · K. Wrobel (✉)
Department of Chemistry, University of Guanajuato,
L de Retana No 5, 36000 Guanajuato, Mexico
e-mail: katarzyn@ugto.mx

obtained indicated the importance of metal-mediated generation of reactive oxygen species at different levels of chemical signaling pathway leading to lignification (Kovacic et al. 2009c, 2010, 2011).

Selenium is an important trace element with multiple roles in higher animals and humans (Schrauzer 2009). There is also plenty of evidence that selenium promotes the plant growth and may act as heavy metal antagonist (Pilon-Smits et al. 2009). In particular, its protective role in different plant species exposed to mercury, cadmium, aluminum and arsenic, has recently been addressed (Filek et al. 2008; Pilon-Smits et al. 2009; Zembala et al. 2010). *Lepidium sativum* (garden cress) is an edible vegetable of the Se-accumulating *Brassicaceae* species and it is known for its sensitivity to heavy metals (Czuba and Kraszewski 1994). The ability of this plant for selenium and cadmium uptake and accumulation has been demonstrated (Pedrero et al. 2008; Frias et al. 2010; Yanez Barrientos et al. 2012). The effect of individual or simultaneous exposure to cadmium [Cd(II) as cadmium chloride] and selenium [Se(IV) as sodium selenite] on several plant parameters had been studied (Yanez Barrientos et al. 2012). The results obtained indicated that cadmium toxicity in this plant species is manifested by growth inhibition, lower status of micronutrients and increased oxidative stress. Similarly, concentration-dependent but less pronounced phytotoxic effects were observed if only Se(IV) was added to the growth medium. In garden cress cultures grown under simultaneous exposure to Cd(II) and Se(IV) up to 2.0 mg L^{-1} , the adverse effects of both elements tended to disappear. In particular, a protective role of selenium against cadmium toxicity was clearly observed and it was proposed that this beneficial function of selenium might be due to the direct interaction between two elements (Yanez Barrientos et al. 2012).

The aim of this work was to gain a further insight on the *L. sativum* response to stress imposed by different concentration levels of Cd(II), Se(IV) and Cd(II) + Se(IV) in terms of the accumulation and profile of phenolic compounds and antioxidant activity. The PCs profiles in plant fractions as free, glycosides or esters as well as the antioxidant activity of individual compounds and of plant extracts were evaluated and then investigated by multivariate approach (principal component analysis). The results obtained provide new information on the participation of individual PCs and their bound forms in antioxidant activity in garden cress grown under different exposure conditions, and also supply complementary experimental evidences on the protective role of selenium against cadmium stress, reported previously in this (Yanez Barrientos et al. 2012) and other plant species (Filek et al. 2008; Zembala et al. 2010). Finally, this contribution supports recent studies (Kovacic et al. 2008; Cohen and

Kennedy 2010; Yuan et al. 2010; Atkinson et al. 2011) demonstrating that appropriate management of abiotic or biotic stress may stimulate PC metabolism and thus enhance both the nutritional quality and plant tolerance under heavy metal stress.

Materials and methods

All chemicals were of analytical reagent grade (Sigma-Aldrich). HPLC grade solvents (Fisher Scientific) and deionized water were used throughout ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Labconco, USA).

Reagents

The following phenolic compounds from Sigma were used: benzoic acid (1), 4-hydroxybenzaldehyde (2), resorcinol (3), salicylic acid (4), vanillin (5), cinnamic acid (6), 3-hydroxybenzoic acid (7), 4-hydroxybenzoic acid (8), syringaldehyde (9), 3,4-dimethoxybenzoic acid (10), 2,3-dihydroxybenzoic acid (11), 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (12), vanillic acid (13), homovanillic acid (14), 2,5-dihydroxybenzoic acid (15), *trans* 2-hydroxycinnamic acid (16), protocatechuic acid (17), shikimic acid (18), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (19), homogentisic acid (20), *trans* 3-hydroxycinnamic acid (21), quinic acid (22), syringic acid (23), *p*-coumaric acid (24), gallic acid (25), ferulic acid (26), caffeic acid (27), sinapic acid (28), chlorogenic acid (29) and *o*-anisic acid as internal standard (IS). For the assay of antioxidant activity, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was also from Sigma.

Plant growth

Lepidium sativum cv. *Ogrodowa* seeds were purchased in the garden-specialized market in Poland. The seeds were sterilized in 70 % ethanol (3 min), then in 3.1 % sodium hypochlorite (15 min) and washed with sterile deionized water. The seeds were soaked in deionized water for 1 h and then, hydroponic germination was carried out in Hoagland's nutrient solution containing calcium nitrate 0.35 mM, calcium chloride 2.1 mM, magnesium sulfate 0.91 mM, monobasic sodium phosphate 0.97 mM, potassium nitrate 1.22 mM, boric acid 23 μM , manganese chloride 3.9 μM , molybdenum trioxide 0.5 μM , ferric nitrate 10 μM , zinc nitrate 0.6 μM , copper sulfate 0.5 μM , pH 5.8 (Yanez Barrientos et al. 2012). After 5 days, the germinated seeds were divided in 13 groups (250 seeds each) and further grown for 2 weeks at different exposure conditions. Cadmium chloride [Cd(II)], sodium selenite [Se(IV)] or both salts were added to the nutrient solution

to obtain the following concentrations of cadmium: 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg L⁻¹; selenium: 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg L⁻¹ and their mixtures: 0.5 + 0.5, 0.5 + 2.0, 2.0 + 0.5, 2.0 + 2.0 mg L⁻¹ of Cd(II) and Se(IV), respectively. Control group was also obtained. Finally, the whole plants were harvested, washed with 0.05 M calcium chloride and with deionized water, ground in liquid nitrogen and freeze-dried.

Determination of selenium and cadmium in freeze-dried biomass

Three aliquots (100 mg) of each sample were wet digested with concentrated nitric acid and hydrogen peroxide as described elsewhere (Corrales Escobosa et al. 2010). The volume was brought to 25 mL with deionized water, the samples were fivefold diluted and internal standard was added (IS, In, final concentration 4 µg L⁻¹).

A model 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a Meinhard nebulizer and Peltier-cooled spray chamber (2 °C) was used. The instrument operating conditions were as follows: forward power 1,500 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 10 mm, nickel sampling and skimmer cones, dwell time 100 ms per isotope, collision/reaction cell gas He, 4 mL min⁻¹. The isotopes ⁷⁸Se, ¹¹¹Cd were monitored (¹¹⁵In as IS).

External calibration was performed using multi-element standard solution [0.1 % nitric acid (v/v)] at element concentration levels 0–10 µg L⁻¹ with the addition of the internal standard (4.0 µg L⁻¹ In). The analytical accuracy was demonstrated by analyzing two certified reference materials NIST 1643d and NIST 1572.

Extraction of phenolic compounds

Three biomass extracts were obtained for each pooled sample that corresponded to the following fractions of phenolic compounds: (F1) free, (F2) soluble glycoside-bound and (F3) ester-bound in the cell wall. For this purpose, the procedure reported previously (de Ascensao and Dubery 2003) was slightly modified. In brief, internal standard (15 ng *o*-anisic acid) was added to 50 mg of the freeze-dried material, the mixture was homogenized (polytron) with 1.5 mL of 70 % (v/v) methanol and centrifuged at 10,000g for 10 min. The pellet was re-suspended in 1 mL 90 % (v/v) methanol, vortexed 1 min, and centrifuged. The two supernatants were combined and evaporated at 45 °C (SpeedVac). Then, 200 µL of trichloroacetic acid 5 % (m/v) was added and the F1 fraction was extracted with two 500 µL portions of ethyl acetate:cyclohexane (1:1). The organic phases were combined

and evaporated to dryness. For glycoside-bound soluble fraction (F2), the aqueous phase remaining after acetate:cyclohexane extraction was acidified with 12 mol L⁻¹ HCl (final HCl concentration 4 mol L⁻¹) and incubated for 1 h at 80 °C. After hydrolysis, the reaction mixture was extracted 2 times with 500 µL of ethyl acetate:cyclohexane (1:1) and the combined extract was evaporated to dryness. Similarly as for F1, 15 ng of *o*-anisic acid was added as IS. The fraction of phenolics bound to cell walls was extracted from the pellet: 4 mol L⁻¹ sodium hydroxide, internal standard (15 ng of *o*-anisic acid) were added and the mixture was incubated at 25 °C for 4 h to release the ester-bound compounds (F3). Then, the sample was acidified to pH 2 with HCl, centrifuged at 10,000g for 10 min, the supernatant was extracted 2 times with 500 µL of ethyl acetate:cyclohexane (1:1) and the combined extract was evaporated to dryness.

Gas chromatography procedure (GC-FID)

About 50 mg of each freeze-dried extracts (F1–F3) were re-dissolved in 50 µL of pyridine and 50 µL of BSTFA + TMCS (99:1) were added. The derivatization reaction was completed at 70 °C for 15 min.

A Clarus 500 gas chromatograph with flame ionization detector (Perkin-Elmer, USA) was used with a ZB-5 capillary column (30 m × 0.25 mm, film 0.25 µm, Phenomenex, USA) and hydrogen 1.6 mL min⁻¹ as a carrier gas. The injection volume was 1 µL (split 1:10), inlet temperature 250 °C, temperature gradient 100–340 °C, separation time 27 min, detector temperature 360 °C and hydrogen 45 mL min⁻¹, and air 450 mL min⁻¹ as detector gases. Five-point calibration was performed using a series of mixed standard solutions containing 29 PCs in the concentration range 0–200 mg L⁻¹ each (*R*² 0.9972–0.9999). The identification of phenolic compounds in the plant extracts was based on their retention times.

Liquid chromatography procedure (HPLC–DAD/FLD)

The extracts F1 and F2 obtained from 50 mg of plant sample were re-dissolved in 300 µL of the initial mobile phase and 40 µL was introduced to the chromatographic system, adopting the procedure previously used (Corrales Escobosa et al. 2010). The phenolic compounds determined were (1), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (16), (24), (26), (27), (28), (29) and *o*-anisic acid as IS.

An Agilent series 1200 liquid chromatograph equipped with an autosampler, a diode array detector (DAD), a spectrofluorometric detector (FLD) and Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used. The chromatographic column was Luna C18(C2) (250 × 4.6 mm, 5 µm) with an extended guard column, both from

Phenomenex. The column was kept at 35 °C and the separation was achieved in 14 min, using gradient elution with 3 mobile phases [deionized water, acetonitrile–methanol (1:1, v/v), 30 mmol L⁻¹ phosphate buffer pH 2] and the total flow rate 1.0 mL min⁻¹. Diode array detector was set at 280, 254 and 310 nm, fluorimetric detection was carried out with excitation wavelength 305 nm and emission at 365, 407, and 436 nm. For external calibration, the mixed standard solutions in the concentration range 0–20.0 mg L⁻¹ of each PC were used with acceptable linearity ($R^2 > 0.999$). In plant extracts, phenolic compounds were identified by their retention times, UV/VIS and FLD spectra.

ABTS radical-scavenging assay

The procedure was used as reported elsewhere (Huang et al. 2005). In brief, the radical was generated by mixing equal volumes of 7.0 mmol L⁻¹ ABTS and 2.5 mmol L⁻¹ potassium persulfate (final concentration) followed by storage in the dark at room temperature for 16 h. Afterward, the solution was diluted with methanol to give an absorbance of 0.70 ± 0.05 AU at 735 nm (spectrophotometer Spectronic 3000, Milton Roy). Gallic acid in the concentration range 0–0.25 mg L⁻¹ (0–8.75 μ mol L⁻¹) in 75 % methanol (v/v) was used for calibration ($R^2 > 0.997$). For each plant sample, 100 mg of the freeze-dried material was extracted with 2 mL of 75 % (v/v) methanol (vortex, 5 min), the mixture was centrifuged (10,000g, 10 min) and the supernatant was ten times diluted. The aliquot (20 μ L) of diluted sample extract, or calibration solution was mixed with 120 μ L of deionized water, 10 μ L of phosphate buffer 100 mmol L⁻¹, pH 7.0 and, 50 μ L of ABTS radical solution were added. After 10 min, the absorbance was measured at 735 nm and at 470 nm. Analytical signal was defined as $S = A_{735} - A_{470}$ in order to avoid the contribution of possible turbidity and, blank was run in parallel. The capacity of free radical scavenging in plant material was expressed as nmol of gallic acid per mg of the freeze-dried material. The antioxidant activity of individual compounds [(1), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (16), (24), (26), (27), (28), (29)] was also evaluated using this same procedure and the results were expressed as nmol of gallic acid per nmol of phenolic compound.

Statistical analysis

The results presented are the mean obtained for three replicates, standard deviations were calculated and graphs were plotted using Microsoft Excel 2007. To observe possible relationships among variables measured, principal component analysis (PCA) was performed (Unscrambler 7.5, Camo, Norway).

Results and discussion

Selenium and cadmium concentration levels in the exposed plants

The concentration ranges for Cd(II) (0.5–5.0 mg L⁻¹) and Se(IV) (0.2–2.0 mg L⁻¹) in the nutrient solution were selected based on the results of earlier studies (Yanez Barrientos et al. 2012). For each exposure condition, the two elements were determined in the biomass obtained and the results are presented in Table 1. In agreement with our previous experiments with the same plant species yet slightly different exposure conditions, concentration-dependent uptake of selenium and cadmium was observed under individual exposure to any of these element forms (Yanez Barrientos et al. 2012). Furthermore, when two elements were added simultaneously to the growth medium their uptake decreased with respect to individual exposure conditions, the same effect being observed and discussed by Yanez Barrientos et al. (2012) but also reported for other plant species (Zembala et al. 2010) and different organisms (Serafin Muñoz et al. 2007; Caballero Arauz et al. 2008). Once the uptake of selenium and cadmium by *L. sativum* under different exposure conditions had been confirmed, this study focused on the possible impact of the two elements on phenolic compounds and antioxidant activity in the plant cultures.

Analysis of phenolic compounds

The GC-FID procedure was set for the resolution of 29 compounds that were found in the *L. sativum* extracts. In

Table 1 Selenium and cadmium concentration levels determined in the freeze-dried plant material at different exposure conditions

Concentration in the nutrient solution (mg L ⁻¹)		Concentration found in the freeze-dried biomass \pm SD (μ g g ⁻¹)	
Cd(II)	Se(IV)	Cd	Se
na	na	0.29 \pm 0.05	0.38 \pm 0.08
na	0.2	0.27 \pm 0.07	11.0 \pm 0.41
na	0.5	0.31 \pm 0.08	27.2 \pm 0.66
na	1.0	0.26 \pm 0.03	43.6 \pm 2.27
na	2.0	0.26 \pm 0.07	93.2 \pm 2.96
0.2	na	52.1 \pm 0.79	0.55 \pm 0.01
1.0	na	78.1 \pm 3.60	0.40 \pm 0.01
2.0	na	148 \pm 4.61	0.52 \pm 0.04
5.0	na	359 \pm 9.84	0.50 \pm 0.12
0.5	0.5	50.1 \pm 1.51	29.6 \pm 0.81
2.0	0.5	130 \pm 2.49	27.5 \pm 0.97
0.5	2.0	40.3 \pm 1.04	97.5 \pm 2.87
2.0	2.0	111 \pm 3.39	80.2 \pm 2.19

na not added to the growth medium

the control plants, the concentration levels evaluated as a sum of three fractions (F1–F3) for benzoic (1), cinnamic (6), syringic (23), gallic (25), ferulic (26), chlorogenic (29) 3,4-dimethoxybenzoic (10), 4-hydroxybenzoic (8), protocatechuic (17), caffeic (27), sinapic (28), quinic (22), *p*-coumaric (24), salicylic (4), vanillic (13), homogentisic (20) acids and syringaldehyde (9) were found in the range 50–200 $\mu\text{g g}^{-1}$; while 3,4-dihydroxyphenylacetic (19), shikimic (18), *trans* 2-hydroxycinnamic (16), *trans* 3-hydroxycinnamic (21), 2,3-dihydroxybenzoic (11), 2,5-dihydroxybenzoic (15), homovanillic (14), 3-hydroxybenzoic (7), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acids (12), resorcinol (3), 4-hydroxybenzaldehyde (2) and vanillin (5) were in the concentrations below 50 $\mu\text{g g}^{-1}$. In general, these results are consistent with data reported for other plants; however the variety of compounds and their concentrations always were dependent on the plant species, growth conditions, tissues analyzed and extraction procedure applied (Fiamegos et al. 2004; Arimboor et al. 2008; Kovacic et al. 2009b; Khadem and Marles 2010; Rababah et al. 2011). For *L. sativum* grown in the presence of Cd(II) or Se(IV), different distribution of individual PCs was observed, specifically in the fractions F1 and F2 corresponding to soluble PCs. On the contrary, no significant differences were observed in PCs contained in cell-bound fraction F3, possibly due to the short time of experiment (14 days). Based on these preliminary results, the fractions F1 and F2 were considered in further work.

It should be noted that GC-FID was used as a screening method; in order to confirm the results obtained and to get additional data on the relationships among exposure conditions, soluble phenolic compounds (F1, F2) and antioxidant activity in *L. sativum*, the determination of compounds (1), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (16), (24), (26), (27), (28), (29) was carried out by reversed phase liquid chromatography with spectrophotometric and spectrofluorimetric detection (HPLC–DAD/FLD), using the procedure established previously (Corrales Escobosa et al. 2010). For individual compounds, relative differences between the GC-FID and HPLC–DAD/FLD results were in the range 15–25 %, indicating reasonable consistency of the analytical data. As already mentioned, GC-FID enabled screening of up to 29 phenolic compounds, whereas HPLC–DAD/FLD provided higher sensitivity and precision.

The HPLC–DAD/FLD results obtained for individual compounds in F1 and F2 fractions are presented in Tables 2 and 3, respectively. It can be observed that for plants exposed to cadmium, the PCs levels in F1 fraction tended to decrease with increasing concentration of stressor ion, while in F2 fraction the effect apparently was opposite. For plants exposed to selenium, the observed changes were less marked in F2, while in F1 the augmenting

concentrations of Se(IV) were associated with the raise of PCs levels. Finally, in plants exposed to the Cd(II) and Se(IV) mixtures, the changes observed in the presence of a single stressor were clearly attenuated.

Analysis of antioxidant activity

ABTS radical-scavenging assay was selected because it has often been used to evaluate contribution of individual PCs to total antioxidant capacity of plants and food (Benavente-Garcia et al. 2000; Chun et al. 2003; Pellegrini et al. 2003; Nenandis et al. 2004; Huang et al. 2005). In this procedure, the absorbance maximum of radical cation corresponds to 734 nm, the radical presents high solubility in polar and non-polar solvents and a wide range of pH can be used.

The results obtained in plant extracts for three independent replicates performed in different days are presented in Fig. 1. It can be observed that relatively low concentrations of Cd(II), Se(IV) or their mixture were associated with the increased antioxidant activity as compared to the control plants. For plants exposed to Cd(II), the increased activity was observed for all concentrations tested (Fig. 1a); however for Se(IV) $>0.5 \text{ mg L}^{-1}$ the antioxidant activity tended to decrease down to the value slightly elevated with respect to that found in the control plant (Fig. 1b). It seemed interesting that for simultaneous exposure to Cd(II) and Se(IV) in the concentration range 0.5–2.0 mg L^{-1} each, the effect observed under exposure to individual stressor was attenuated and the antioxidant activity remained at relatively unvarying level (Fig. 1c); however, by further increasing the concentration of any stressor above 2.0 mg L^{-1} the observed stabilization effect of simultaneous exposure disappeared and AOx activity was similar as that observed for elevated Cd(II) concentration.

General limitations of radical-scavenging spectrophotometric assays involve the instability of mediator radical and the lack of selectivity (Huang et al. 2005; Osman et al. 2006). Consequently, antioxidant activities of pure compounds were assessed in various studies in order to evaluate their potential contribution to the antioxidant properties of food-related products or plants (Rice-Evans et al. 1996; Benavente-Garcia et al. 2000; Chun et al. 2003; Pellegrini et al. 2003; Nenandis et al. 2004; Huang et al. 2005). These authors used preferentially the ABTS assay and this strategy was also employed in the present work, as described in “Materials and methods”. Gallic acid was used as calibrator and the relative antioxidant activity of individual PCs (k) was expressed as the molar ratio between the ABTS equivalent amount of gallic acid (n_{GA}) and phenolic compound taken for the assay (n_{PC}). Due to higher reliability of HPLC–DAD/FLD results, the 13 PCs quantified by this procedure were examined and the results obtained are presented in Table 4. The highest antioxidant

Table 2 Concentration levels of individual phenolic compounds determined by HPLC–DAD/FLD in F1 fraction, for plants grown in different exposure conditions

PCs	PC concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) (freeze-dried biomass)												
	Exposure conditions: Cd(II) or Se(IV) in the growth medium (mg L^{-1})												
	Control	Cd(II)				Se(IV)				Se(IV) + Cd(II)			
0	0.5	1.0	2.0	5.0	0.2	0.5	1.0	2.0	0.5 + 0.5	2.0 + 0.5	0.5 + 2.0	2.0 + 2.0	
Ferulic acid	35.2	34.9	29.4	24.4	25.6	35.8	34.1	32.1	35.2	37.2	34.2	26.0	30.1
Chlorogenic acid	21.4	22.5	20.8	15.2	13.7	26.9	34.8	35.2	29.2	22.5	21.0	18.9	19.4
Cinnamic acid	18.2	20.1	20.0	19.6	18.2	23.6	22.0	19.9	20.4	19.2	20.2	18.9	17.1
Benzoic acid	17.2	16.5	16.9	14.6	14.0	16.9	18.1	17.4	18.5	18.2	15.9	16.4	18.8
Caffeic acid	37.2	40.1	32.7	29.1	34.6	40.5	43.8	43.1	47.6	36.8	32.1	30.1	32.3
Vanillic acid	43.1	40.6	40.8	38.6	35.8	53.9	62.7	44.9	35.5	30.6	25.8	32.0	36.3
<i>p</i> -Coumaric acid	20.6	21.6	19.7	20.5	21.2	23.3	25.3	23.4	23.1	21.3	21.1	21.6	22.5
Sinapic acid	18.4	23.0	13.1	12.5	8.4	16.8	17.0	16.2	18.7	19.4	17.1	17.0	20.6
Salicylic acid	24.1	22.9	25.2	23.7	26.2	25.1	24.9	23.8	25.5	24.5	23.6	25.8	28.0
<i>p</i> -Hydroxybenzoic	21.2	22.8	20.5	19.7	18.2	24.3	20.5	20.9	23.1	24.6	21.9	23.6	27.3
<i>t</i> -2-Hydroxycinnamic	nd	nd	4.0	nd	2.5	4.7	4.5	3.2	5.1	5.3	nd	nd	5.0
2,5-Dihydroxybenzoic	nd	nd	nd	5.4	3.3	nd	nd	6.6	5.7	nd	4.7	5.2	5.4
2,3-Dihydroxybenzoic	nd	nd	nd	6.2	4.2	nd	2.9	4.7	4.9	nd	nd	4.9	6.9
Total	256.6	265.0	243.1	229.5	225.9	291.8	310.6	291.3	292.5	259.6	245.7	240.4	269.7

nd not detected

Table 3 Concentration levels of individual phenolic compounds determined by HPLC–DAD/FLD in F2 fraction, for plants grown in different exposure conditions

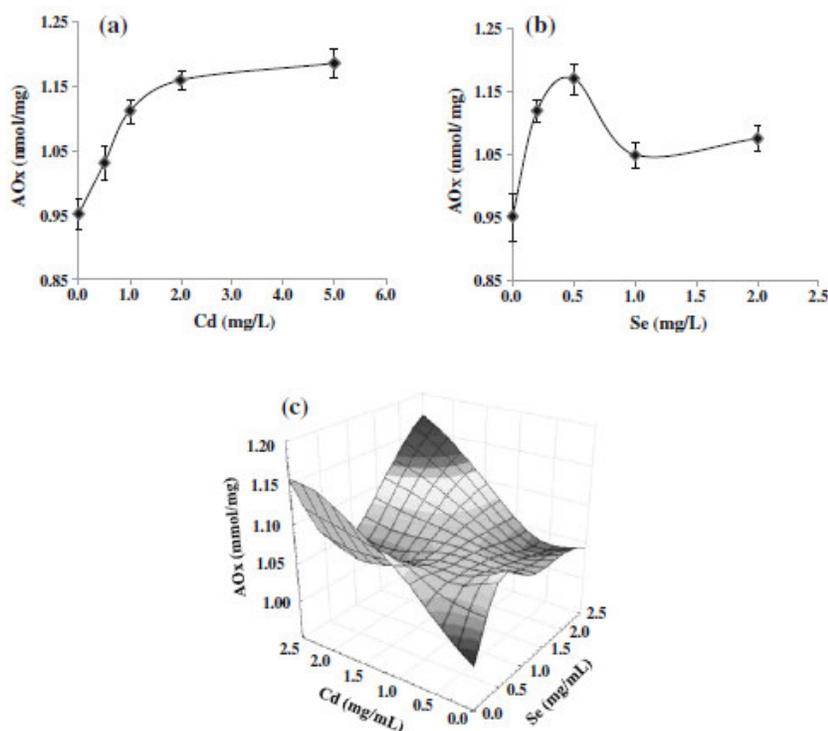
PCs	PC concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) (freeze-dried biomass)												
	Exposure conditions: Cd(II) or Se(IV) in the growth medium (mg L^{-1})												
	Control	Cd(II)				Se(IV)				Se(IV) + Cd(II)			
0	0.5	1.0	2.0	5.0	0.2	0.5	1.0	2.0	0.5 + 0.5	2.0 + 0.5	0.5 + 2.0	2.0 + 2.0	
Ferulic acid	48.6	58.2	51.7	59.1	78.2	47.3	49.7	50.3	52.3	49.1	46.0	40.6	50.5
Chlorogenic acid	nd	2.8	2.5	4.7	11.3	nd	4.3	4.9	nd	nd	nd	3.2	8.5
Cinnamic acid	10.3	10.3	12.1	12.6	14.0	9.5	9.9	10.2	12.2	11.4	10.4	10.1	11.0
Benzoic acid	13.1	13.9	15.5	17.1	17.5	14.1	14.9	14.7	15.7	12.1	12.7	11.2	13.6
Caffeic acid	19.9	24.2	19.1	21.1	22.5	24.7	25.0	24.9	27.5	16.0	17.6	10.9	23.6
Vanillic acid	28.6	33.8	34.4	37.7	42.8	30.1	31.0	32.2	33.4	25.3	22.4	26.6	33.5
<i>p</i> -Coumaric acid	40.1	41.4	46.8	49.7	52.1	36.8	34.8	32.9	34.2	36.2	38.5	38.3	46.8
Sinapic acid	17.1	19.2	21.3	25.4	33.6	15.1	15.9	15.7	16.5	15.1	16.1	14.8	19.7
Salicylic acid	10.5	10.4	11.7	12.4	12.5	10.4	11.2	11.1	10.3	8.5	10.4	7.7	11.9
<i>p</i> -Hydroxybenzoic	23.8	25.1	26.2	27.4	29.2	26.8	26.5	27.4	26.5	19.2	19.8	19.0	21.7
<i>t</i> -2-Hydroxycinnamic	nd	nd	nd	7.0	5.7	nd	nd	2.1	4.8	nd	nd	nd	nd
2,5-Dihydroxybenzoic	nd	nd	3.8	5.2	5.9	3.3	3.0	4.0	4.5	nd	2.7	nd	4.4
2,3-Dihydroxybenzoic	nd	nd	2.7	4.2	2.5	2.7	2.5	2.1	3.2	nd	2.2	1.5	3.5
Total	212.0	239.3	247.8	283.6	327.5	220.8	228.4	232.5	241.1	192.8	198.8	183.7	248.7

nd Not detected

activity was found for *p*-coumaric acid (24) and sinapic acid (28) ($k > 0.9$), in agreement with earlier reports (Nenandis et al. 2004). Relatively lower activities ($0.54 < k < 0.66$) were obtained for ferulic acid (26), 2, 3-dihydroxybenzoic acid (11), vanillic acid (13) and *trans*

2-hydroxycinnamic acid (16), while for the rest of PCs the k value was below 0.44. ABTS assay did not detect anti-oxidant activity of salicylic acid (4), benzoic acid (1) and cinnamic acid (6), so these three PCs were not considered further.

Fig. 1 Antioxidant activity assessed by ABTS assay in *L. sativum* extracts at different exposure conditions: **a** only Cd(II), **b** only Se(IV), **c** all exposure conditions



From the results of PCs determination in fractions F1 (Table 2) and F2 (Table 3), for each plant culture the antioxidant activity (AOx) corresponding to these two fractions was calculated, using the following formula:

$$AOx = \sum_{i=1}^{i=10} (k_i \times c_i)$$

(c_i —molar concentration of individual PC, k_i —respective value from Table 4). The results obtained are shown in Fig. 2. For plants exposed to Cd(II) alone, a decrease of antioxidant activity conferred by free phenolics (F1) was found in the concentration range 0.5–2.0 mg L⁻¹ Cd(II) (Fig. 2a), whereas in these same exposure conditions the antioxidant activity related to glycoside-bound phenolics (F2) increased with respect to the control plant (Fig. 2b), in agreement with the results presented in Table 3. Different results were obtained for plants exposed individually to Se(IV); for concentration <1.5 mg L⁻¹ the antioxidant activity associated with free PCs (F1) increased as compared to the control plants and plants exposed to Cd(II), whereas selenium effect on glycoside-bound PCs was less pronounced with respect to that observed for Cd(II) (Fig. 2a, b). On the other hand, for plants grown in the presence of the two stressors [Cd(II) + Se(IV),

0.5–2.0 mg L⁻¹ each], the AOx values were relatively stable and lower with respect to those assessed in plants exposed only to Cd(II) or Se(IV), as shown by a flat region of the response surfaces in Fig. 2a, b.

In Fig. 2c, the contribution of ten phenolic compounds determined in F1 + F2 fractions to AOx activity is presented and it can be observed that the response surface resembles that obtained by ABTS assay performed directly in methanol plant extracts (Fig. 1c). These results indicate that ten compounds used for the evaluation of AOx in F1 and F2 as the sum of individual PCs (Tables 2, 3, 4) would contribute significantly to the overall antioxidant activity of free- and glycoside-bound phenolics in *L. sativum*. Furthermore, these results confirm that AOx in *L. sativum* increased under exposure to a single stressor, however for Cd(II) this effect was associated with the increase of glycoside-bound PC, whereas for Se(IV) it was apparently due to the higher concentration levels of free PCs (considering ten PCs, Tables 2, 3, 4). The attenuation of AOx values under simultaneous exposure to Cd(II) + Se(IV) in their concentration range 0.5–2.0 mg L⁻¹ seems to strengthen previously reported experimental evidence on the interaction between these two stressors in *L. sativum* (Yanez Barrientos et al. 2012). It should be noted, however, that at elevated concentration levels of the two elements (>2.0 mg

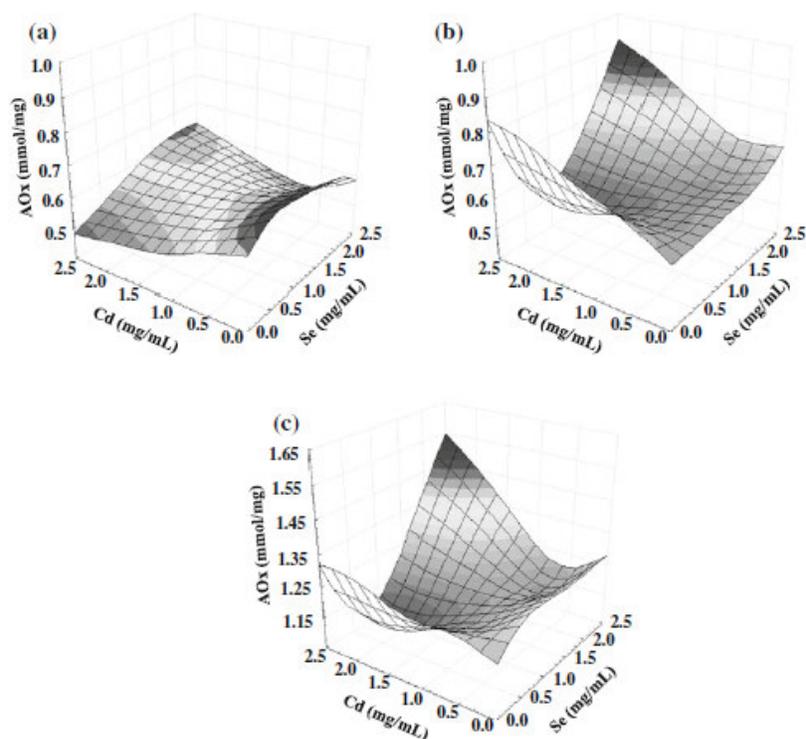
Table 4 Antioxidant activity of individual phenolic compounds, evaluated by ABTS radical-scavenging assay

PCs number	Phenolic compound (PC)	n_{PC} (nmol)	n_{GA} (nmol)	$k = n_{GA}/n_{PC}$
24	<i>p</i> -Coumaric acid	2.00	1.84	0.92
28	Sinapic acid	2.00	1.85	0.92
11	2,3-Dihydroxybenzoic acid	2.00	1.31	0.66
26	Ferulic acid	2.00	1.32	0.66
13	Vanillic acid	2.00	1.08	0.54
16	<i>trans</i> 2-Hydroxycinnamic acid	2.00	0.89	0.44
27	Caffeic acid	2.00	0.72	0.36
29	Chlorogenic acid	2.00	0.73	0.36
15	2,5-Dihydroxybenzoic acid	2.00	0.58	0.29
8	4-Hydroxybenzoic acid	20.0	2.80	0.14
1	Benzoic acid	20.0	nd	–
4	Salicylic acid	20.0	nd	–
6	Cinnamic acid	20.0	nd	–

n_{PC} nanomoles of phenolic compound in testing solution, n_{GA} equivalent nanomoles of gallic acid, *nd* not detected

L⁻¹) the beneficial effect disappeared, which calls for further investigation on putative selenium–cadmium interaction in this vegetable species.

Fig. 2 Antioxidant activity evaluated as the sum of individual PCs contributions in fraction F1 (a), fraction F2 (b) and the sum F1 + F2 (c)



Multivariate analysis

In search of possible relationships among the variables measured, multivariate statistical analysis was carried out. Principal component analysis (PCA) was used, since this method reduces the number of variables observed to a smaller set of artificial variables (called principal components) that would account for most of the variance in the raw data. As a result, partial visualization of the data structure in a reduced dimension is obtained (Rodríguez Flores et al. 2009).

In the first approach, the GC-FID results and the antioxidant activity evaluated directly in the plant extracts were considered. For all analytical data obtained for 13 plant cultures and 2 fractions (F1 and F2), the first 3 components in PCA accounted for less than 45 % of total data variability, for which it was decided to reduce the number of variables and to use only HPLC–DAD/FLD data and the results of ABTS assay for individual compounds (Fig. 2). In the PCA model obtained, the first 2 principal components accounted for 75 % of total data variability. In Fig. 3a, the two-dimensional plot of the sample scores is presented. As observed, there exists a good separation of samples corresponding to fraction F1 (bold letters) and fraction F2 (underlined, italic letters) with respect to the

first principal component (PC1). The second principal component (PC2) is apparently related to the exposure conditions, since control samples are located close to its zero value and samples corresponding to elevated exposure conditions are moved toward higher PC2 values.

In Fig. 3b, two-dimensional plot of variable loadings is presented, where antioxidant activity is associated directly with exposure to cadmium and inversely with selenium. In this regard, PCA model confirms that challenging *L. sativum* with cadmium would result in the Cd(II) concentration-dependent increase of AOX, in agreement with the results presented in Figs. 1 and 2 and those reported for other plant species (Sivaci et al. 2007; Kovacik and Klejdus 2008; Marquez-Garcia et al. 2010). In the case of selenium, PCA model indicates the inverse relationship between the exposure conditions and AOX; element levels $<1.5 \text{ mg L}^{-1}$ in the growth medium promote antioxidant activity but the increase of Se(IV) concentration would result in the drop of AOX, in support to the previous studies performed on garlic (Poldma et al. 2011) and broccoli (Finley et al. 2005) and in agreement with data shown in Figs. 1 and 2. The inverse relationship between Se and Cd variables is consistent with putative interaction between these two elements in *L. sativum* (Yanez Barrientos et al. 2012), that would be responsible for attenuation of plant response under simultaneous exposure to Cd(II) + Se(IV) with respect to that observed in the presence of one stressor (Figs. 1, 2, 3). Similar effects were found for other vegetal species, where selenium supplementation helped the plant to minimize cadmium phytotoxic and, in particular oxidant effects (Pedrero et al. 2008). It should be also noted that in PCA model (Fig. 3), selenium variable is located together with chlorogenic (29), 2,5-dihydroxybenzoic (15), caffeic (27), *p*-coumaric (24) and vanillic (13) acids in the space of free phenolics (F1), suggesting that Se might challenge the synthesis of at least these PCs. On the other hand, cadmium variable is located in the same plane with sinapic (28), ferullic (26), *trans* 2-hydroxycinnamic (16), 4-hydroxybenzoic (8) and 2,3-dihydroxybenzoic (11) acids in the space corresponding to glycoside-bound PCs (F2), which suggests that Cd stress would favor formation of lignin precursors to aid cell wall reinforcement, a defensive mechanism often reported in plants exposed to biotic and abiotic stress (de Ascensao and Dubery 2003; Corrales Escobosa et al. 2010; Kovacik et al. 2010).

Conclusions

The results obtained in this work provide further experimental evidences on the impact of abiotic stress imposed by Cd(II), Se(IV) and Cd(II) + Se(IV) in *L. sativum*. In particular, the exposed plants presented different profiles of

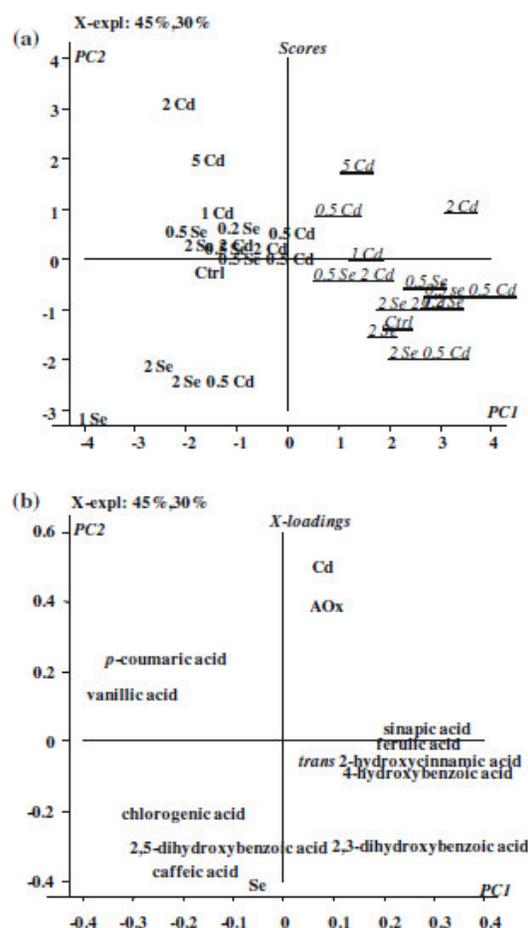


Fig. 3 PCA model obtained for F1 and F2 phenolic fractions from 13 plant cultures. **a** Scores plot—**bold letters** correspond to F1 fractions and underlined, italic letters to F2 fractions, both from plants exposed to Cd(II), Se(IV) or their mixtures; **b** X-loadings plot, the *variables* correspond to the exposure conditions (Cd or Se concentration in the growth medium), individual PCs determined in F1 and F2 by liquid chromatography (HPLC–DAD/FLD) and antioxidant activity evaluated as the sum of contributions of individual PCs

phenolic compounds as compared to control, particularly in the fractions F1 and F2 that correspond to free PCs and water soluble glycoside-bound PCs, respectively. The plant response was element-, and concentration-dependent, and it was different when only one or two stressing agents were present [Cd(II), Se(IV), Cd(II) + Se(IV)]. Challenging with Cd(II) resulted in the increased antioxidant activity conferred by glycoside-bound phenolic compounds, potentially participating in the lignifications processes, whereas for selenium the increase of AOX was less marked but associated with free phenolic compounds. In this

regard, the controlled exposure to Se(IV) might be an interesting approach to enhance nutritional quality of garden cress in terms of antioxidant activity conferred by bioavailable, free PCs and in terms of micronutrient selenium content. Furthermore, under simultaneous exposure to Cd(II) and Se(IV) ($0.5\text{--}2.0\text{ m L}^{-1}$), the changes in antioxidant activity associated with the presence of only one stressor were attenuated, supporting previously reported data on the protective role of Se(IV) against oxidative stress imposed by Cd(II) in *L. sativum* (Yañez Barrientos et al. 2012). The evaluation of antioxidant activity for individual PCs and the results of multivariate analysis (PCA) enabled affirmation of the above relationships, and reinforce the perception that selenium exposure might activate the synthesis of free PCs, while cadmium stress would initiate PCs binding possibly resulting in the cell wall strengthening.

Author contribution Julio Cesar Torres Elguera carried out the fractionation and chromatographic analyses of phenolic compounds, and also accomplished ABTS assay for individual compounds and in plant extracts; Eunice Yañez Barrientos carried out plant growth and ICP-MS element determination; Kazimierz Wrobel substantially contributed to experimental design, carried out statistical analysis and provided important intellectual contributions; Katarzyna Wrobel designed the study, contributed in data analysis and wrote the initial manuscript draft. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), project 178553, is gratefully acknowledged.

References

- Arimboor R, Sarin Kumar K, Arumughan C (2008) Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 47:31–38
- Atkinson NJ, Dew TP, Orfila C, Urwin PE (2011) Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Agric Food Chem* 59:9673–9682
- Babar AM, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek KY (2006) Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of Panax ginseng in response to copper stress. *Plant Sci* 171:147–154
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio JA (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem* 68:457–462
- Boudet AM (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:2722–2735
- Caballero Arauz IL, Afton S, Wrobel K, Canuso JA, Gutierrez Corona FJ, Wrobel K (2008) Study on the protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic bacteria: an advanced application of ICP-MS. *J Hazard Mater* 153:1157–1164
- Chun OK, Kim DO, Moon HY, Kang HG, Lee CY (2003) Contribution of individual phenolics to total antioxidant capacity of plums. *J Agric Food Chem* 51:7240–7245
- Cohen SD, Kennedy JA (2010) Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:620–643
- Corrales Escobosa AR, Wrobel K, Landero Figueroa JA, Gutierrez Corona FJ, Wrobel K (2010) 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* 58:12392–12398
- Czuba M, Kraszewski A (1994) Long-term cadmium exposure accelerates oxidant injury: significance of bound/free water states during long-term metal stress. *Ecotoxicol Environ Safe* 29:330–348
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352
- de Ascensao AR, Dubery IA (2003) Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63:679–686
- Dutta RK, Maharia RS (2012) Antioxidant responses of some common medicinal plants grown in copper mining areas. *Food Chem* 131:259–265
- Ferreiros F, Sousa C, Pereira DM, Valentao P, Taveira M, Martins A, Pereira JA, Seabra RM, Andrade PB (2009) Screening of antioxidant phenolic compounds produced by in vitro shoots of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. *Comb Chem High Throughput Screen* 12:230–240
- Fiamegos YC, Nanos CG, Vervoort J, Stalikas CD (2004) Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *J Chromatogr A* 1041:11–18
- Filek M, Keskinen R, Hartikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, Gólda A (2008) The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 165:833–844
- Finley JW, Sigrid-Keck A, Robbins RJ, Hintze KJ (2005) Selenium enrichment of broccoli: interactions between selenium and secondary plant compounds. *J Nutr* 135:1236–1238
- Frias J, Gulewicz P, Martinez-Villaluenga C, Penas E, Piskula MK, Kozłowska H, Ciska E, Gulewicz K, Vidal-Valverde C (2010) Changes in nutritional value and cytotoxicity of garden cress germinated with different selenium solutions. *J Agric Food Chem* 58:2331–2336
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2006) Plant antioxidant responses to toxic elements. *Curr Top Biochem Res* 8:41–70
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841–1856
- Khadem S, Marles RJ (2010) Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules* 15:7985–8005
- Kovacic J, Klejduš B (2008) Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep* 27:605–615
- Kovacic J, Backor M, Kadukova J (2008) Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to cadmium and copper excess. *Environ Toxicol* 23:123–130
- Kovacic J, Gruz J, Hedbavny J, Klejduš B, Stmad M (2009a) Cadmium and nickel uptake are differentially modulated by salicylic acid in *Matricaria chamomilla* plants. *J Agric Food Chem* 57:9848–9855

- Kovacik J, Klejdus B, Backor M (2009b) Phenolic metabolism of *Matricaria chamomilla* plants exposed to nickel. *J Plant Physiol* 166:1460–1464
- Kovacik J, Klejdus B, Hedbavny J, Backor M (2009c) Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of *Matricaria chamomilla* plants. *Ecotoxicology* 18:544–554
- Kovacik J, Gruz J, Klejdus B, Stork F, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O (2010) Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H₂O₂ and NO in this process. *Plant Sci* 179:383–389
- Kovacik J, Klejdus B, Hedbavny J, Zon J (2011) Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *J Plant Physiol* 168:576–584
- Marquez-Garcia B, Horemans N, Cuypers A, Guisez Y, Cordoba F (2010) Antioxidants in *Erica andevalensis*: a comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions. *Plant Physiol Biochem* 49:110–115
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud* 15:523–530
- Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY (2004) Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using ABTS assay. *J Agric Food Chem* 52:4669–4674
- Osman AM, Wong KKY, Hill SJ, Fernyhough A (2006) Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 340:597–603
- Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Camara C (2008) Protective effect of selenium in Broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J Agric Food Chem* 56:266–271
- Pellegrini N, Del Rio D, Colombi B, Bianchi M, Brighenti F (2003) Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J Agric Food Chem* 51:260–264
- Pilon-Smits EA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol* 12:267–274
- Poldma P, Tonutare T, Viitak A, Luik A, Moor U (2011) Effect of selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (*Allium sativum* L.). *J Agric Food Chem* 59:5498–5503
- Rababah TM, Ereifej KI, Esoh RB, Al-udatt MH, Alrababah MA, Yang W (2011) Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analysis of phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Nat Prod Res* 25:596–605
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 7:933–956
- 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
- Schrauzer GN (2009) Selenium and selenium-antagonistic elements in nutritional cancer prevention. *Crit Rev Biotechnol* 29:10–17
- Serafin Muñoz AH, Wrobel K, Gutierrez Corona JF, Wrobel K (2007) The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *Mycol Res* 111:626–632
- Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118:21–28
- Sivaci A, Sivaci ER, Sokmen R (2007) Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard exposed to cadmium. *Ecotoxicology* 16:423–428
- Yanez Barrientos E, Rodriguez Flores C, Wrobel K, Wrobel K (2012) Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in *Lepidium sativum*. *J Mex Chem Soc* 56:1–7
- Yuan G, Wang X, Guo R, Wang Q (2010) Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chem* 121:1014–1019
- Zembala M, Filek M, Walas S, Mrowiec H, Kornas A, Miszalski Z, Hartikainen H (2010) Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Soil* 329:457–468

Monitoring of Phosphorus Oxide Ion for Analytical Speciation of Phosphite and Phosphate in Transgenic Plants by High-Performance Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Julio Cesar Torres Elguera, Eunice Yañez Barrientos, Katarzyna Wrobel, and Kazimierz Wrobel*

Department of Chemistry, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico

ABSTRACT: Large amounts of phosphate fertilizers utilized in agriculture and their relatively poor efficiency are of high ecological and economic concern. Therefore, transgenic plants capable of metabolizing phosphite are being engineered. In support of this biotechnological task, analytical speciation of phosphorus in biological tissues is required. In this study, plant extracts were analyzed by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry at m/z of elemental phosphorus and phosphorus oxide ions. Using polymeric-based anion exchange column and millimolar concentration of nitric acid in potassium phthalate mobile phase (pH 2.5), phosphite and phosphate ions were baseline resolved with retention times 6.95 ± 0.03 and 7.90 ± 0.03 min and with a total chromatographic run time 10 min. The detection limits were 1.58 and $1.74 \mu\text{g P L}^{-1}$ at m/z 47, as compared to 2.18 and $2.04 \mu\text{g P L}^{-1}$ at m/z 31, respectively. The results obtained in real world samples for the two detection modes were in good agreement, yet signal acquisition at m/z 47 enabled better precision without collision/reaction cell (RSD below 2%) as compared to RSD around 4% obtained at m/z 31 using He-pressurized cell (3.5 mL min^{-1}).

KEYWORDS: phosphite, analytical speciation, HPLC, ICP-MS, transgenic plants

INTRODUCTION

Phosphate-based fertilizers have long been used in agriculture even though these products present several drawbacks. In particular, phosphate [P(V)] tends to form insoluble compounds in soil and is also readily converted to organic forms by soil microorganisms; plants are able to take up and effectively use only a small part of phosphorus contained in the supplied fertilizers. The excessive utilization of P(V) seriously contributes to eutrophication processes and results in depletion of nonrenewable phosphate rock resource.¹ Another form of phosphorus in agricultural applications is phosphite [P(III)], commonly used as a crop fungicide and sometimes considered as a biostimulator or an alternative source of P for plant growth.^{2,3} Owing to better mobility of P(III) and similar uptake rates as compared to P(V), a reduced amount of fertilizer might be applied; phosphite, however, cannot be metabolized by plants, and its adverse effects have been reported.⁴ A biotechnological approach toward the efficient delivery and assimilation of phosphorus relies on the generation of transgenic plants that can use phosphite as a sole source of this element.⁵ Because the specific target is to obtain plants capable of oxidation P(III) to P(V), quantitative data on these two phosphorus forms in biological tissues are required in support of plant engineering. It should be stressed at this point that in the majority of studies related to P(III)/P(V) in crop cultivation, total P was routinely evaluated, whereas speciation analysis of two phosphorus oxyanions in plants has seldom been undertaken.^{3,6–10}

Owing to the variety of organic and inorganic phosphorus species present in the plant tissues and because of the complex chemical matrix, selective extraction and cleanup procedure as well as sensitive and interference-free quantification of

phosphorus in the obtained fractions are the most challenging issues in any spectation scheme. In the reported studies, water, diluted formic or acetic acid, water/methanol mixtures at room or elevated temperature, and prolonged shaking time (up to 3 h) have been used; the obtained extracts were further purified by solid phase extraction for elimination of coextracted organic compounds and ionic species; however, evaluation of the extraction yield of individual phosphorus species has rarely been undertaken.^{7,9–13}

Liquid chromatography with conductivity detector has been the predominant technique used in the analysis of phosphorus oxyanions in plant extracts, providing detection limits in the low parts per million concentration range.^{8,9} It is worth mentioning that ion chromatography with gradient elution at elevated pH and with suppressed conductivity detection, as applied to chemically simple water samples, provided low- or even sub-parts per billion detection limits; however, in more demanding samples, poor selectivity was highlighted as an important limitation.^{14,15} Alternatively, precolumn derivatization with diazomethane or *N*-methyl-*tert*-butyldimethylsilyltri-fluoroacetamide was proposed for gas chromatography with flame ionization detector and, again, low parts per million detection limits were reported in plant analysis.^{9,16} The application of ion trap mass spectrometry detection enabled an enhanced detection power (0.1 ng on column).⁹ Selective phosphite fluorometric assay with a detection limit $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (about 0.4 mg L^{-1}) was also developed, on the basis of the

Received: March 18, 2013

Revised: June 18, 2013

Accepted: June 19, 2013

Published: June 19, 2013

enzymatic oxidation to phosphate in the presence of resazurin and subsequent fluorometric measurement of the reduced reagent form.⁷ The hyphenation of atomic spectrometry techniques with liquid chromatography was used in speciation analysis of phosphorus in herbicides,¹⁷ soil extracts,¹⁸ and different natural water matrices,^{15,19,20} yet the feasibility of such an approach in plant analysis has been only recently tested.⁵

Inductively coupled plasma mass spectrometry is generally considered a technique of choice in trace element speciation schemes; however, its application for monoisotopic phosphorus is compromised by the relatively high first ionization potential of this element and troublesome nitrogen-, oxygen-, and carbon-based polyatomic interferences.²¹ Several strategies have been proposed to enhance the analytical performance of P determination by ICP-MS such as elimination of organic sample matrix, minimization of plasma sample load, and use of high-resolution instruments or collision/reaction cell technology. In particular, it was demonstrated that cells pressurized with helium stop polyatomic ions from being introduced to the quadrupole mass filter by discrimination of kinetic energy,^{17,18,22} whereas oxygen introduced to dynamic reaction cells promotes formation of phosphorus oxide ion with m/z 47, which has less pronounced interferences than m/z 31.^{23–25} On the other hand, the enhanced generation of phosphorus oxide ion was achieved by optimization of plasma operating conditions²⁶ and also when the analyzed solution contained nitric acid or methanol.²⁷ Even though as high enhancement of sensitivity as observed in the dynamic reaction cell cannot be expected, this latter option seems quite attractive due to its potential applicability even in the most austere ICP-MS instruments.

In this work, speciation analysis of phosphite and phosphate in transgenic plants had been undertaken by coupling anion exchange liquid chromatography with ICP-MS. Addition of nitric acid to the mobile phase was proposed with the aim to enhance the formation of phosphorus oxide for P detection at m/z 47, thus eliminating the need for oxygen introduction via collision/reaction cell. The sample cleanup procedure, chromatographic separation, and instrumental operating conditions were experimentally selected, and the analytical figures of merit were compared for the elemental and phosphorus oxide ion detection.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation. An Agilent series 1200 liquid chromatographic system equipped with a quaternary pump, a well plate autosampler, a diode array detector, and a ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used. The chromatographic column was a Hamilton PRP-X100 (250 × 4.6 mm, 5 μm). For detection of phosphorus, the column effluent was online introduced to an inductively coupled plasma–mass spectrometry system via a short length (10 cm) Teflon tubing (0.3 mm i.d.).

A model 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was used with a MiraMist Teflon nebulizer. A Peltier-cooled chamber was operated at 2 °C. Standard tuning procedure was performed using Li, Y, Tl, and Ce (1 μg L⁻¹ each), and the obtained parameters were further refined for detection at m/z 47 using a P(V) standard solution in mobile phase (10 μg P L⁻¹). For phosphorus detection at m/z 31, an octopole collision reaction cell was used with a He flow rate of 3.5 mL min⁻¹.²²

Reagents and Samples. All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, Kansas City, MO, USA) and HPLC-grade methanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) were used throughout.

Sodium phosphate dibasic [P(V)], sodium phosphite [P(III)], potassium hydrogen phthalate, nitric acid, EDTA, Supelclean LC-18 SPE tubes (3 mL), and Supelco and IC Acrodisc filters (0.2 μm) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Homogenized and freeze-dried transgenic tobacco plants grown in the presence of P(III) as a sole phosphorus source (samples 1, 2, and 3) and one pooled sample were kindly provided by Dr. Luis Herrera-Estrella from the National Laboratory of Genomics for Biodiversity, Mexico.

Procedures. For extraction of phosphate and phosphite ions, 1.0 mL of 10 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0, was added to 40–50 mg of freeze-dried plant material, and the mixture was placed in an ultrasonic bath for 30 min at room temperature. Afterward, the sample was centrifuged (1000g, 10 min), and the supernatant was collected and cleaned up with Supelclean LC-18 SPE tubes 3 mL (product 57012 Supelco). The tubes were conditioned with 2 mL of methanol and then washed with 2 mL of 10 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8 (solution used for extraction), and 1 mL of the crude extract was passed at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Finally, the sample was filtered through an IC Acrodisc filter (0.2 μm) and, after appropriate dilution with the mobile phase (maximum 20-fold), 100 μL was introduced to the chromatographic system coupled with ICP-MS. Separation was achieved by isocratic elution with 5 mmol L⁻¹ potassium hydrogen phthalate adjusted to pH 2.5 with nitric acid at total flow rate of 1.0 mL min⁻¹ at room temperature. The ICP-MS instrument operating conditions established for detection at m/z 31 and 47 are presented in Table 1.

Table 1. ICP-MS Instrument Operating Conditions

ICP-MS detection	m/z 31	m/z 47
forward power	1500 W	
nebulizer gas flow	0.9 L min ⁻¹	0.85 L min ⁻¹
makeup gas	0.1 L min ⁻¹	0.4 L min ⁻¹
nebulizer	MiraMist Teflon	
spray chamber	Peltier cooled chamber, 2 °C	
sample and skimmer cones	platinum	
sample depth	9 mm	8.5 mm
ion lenses extract 1	2.5 V	-180 V
extract 2	-130 V	-60 V
cell entrance	-30 V	-36 V
QP focus	-15 V	-3 V
cell exit	-50 V	-60 V
OctP RF	100 V	
OctP bias	-18 V	-12 V
acquisition mode	time-resolved analysis	
dwelt time	100 ms	
collision/reaction cell	3.5 mL min ⁻¹ He	no

Quantification was performed by external calibration using mixed P(III) + P(V) standard solutions at five concentration levels (0, 100, 250, 500, and 1000 μg L⁻¹ of phosphorus as P(III) and as P(V), respectively) with five successive injections of each solution; peak area was always used as a signal mode.

Statistical Analysis. Descriptive statistics were performed to obtain means and standard deviations. For the tuning procedure, the surface responses were obtained using The Unscrambler 7.5 software package (CAMO, Oslo, Norway).

RESULTS AND DISCUSSION

The goal of this work was to establish a P(III)/P(V) speciation procedure in which nitric acid addition would enable reliable ICP-MS detection of phosphorus at m/z 47 without use of the collision/reaction cell. In the initial experiments, the separation was carried out on a SAX anion exchange column with 10 mmol L⁻¹ potassium phthalate, pH 4.0; however, the chromatographic peaks were tailed, the background signal for

ICP-MS detection at m/z 31 was elevated (>1600 cps), and sensitivity for m/z 47 was poor.⁵ To enhance analytical performance, it was proposed to use a polymeric-based column and a more dilute mobile phase with the addition of nitric acid and to compare the results obtained for the detection of elemental and phosphorus oxide ions.

The effect of nitric acid on ICP-MS determination of phosphorus at m/z 31 and 47 had already been reported.²⁷ The main focus of the cited study was to evaluate the potential impact of nitric acid as introduced for the digestion of organic samples; therefore, relatively high acid concentrations (up to 2.5 mol L⁻¹) were used, and deteriorated detection limits were obtained for the two ions monitored; however, for lower acid concentrations (<0.1 mol L⁻¹), the undesirable background increase at m/z 47 and the signal decrease at m/z 31 were much less pronounced.²⁷ For this reason and also because low concentration would be required in the mobile phase, the effect of nitric acid on the ICP-MS m/z 47 signal was examined in the concentration range from 0 to 10 mmol L⁻¹. To this end, phosphate standard solution prepared in mobile phase and blank solution (5 mmol L⁻¹ potassium phthalate or deionized water) containing different concentrations of nitric acid were directly aspirated to the plasma. The results are shown in Figure 1. It should be noted that the final tuning conditions

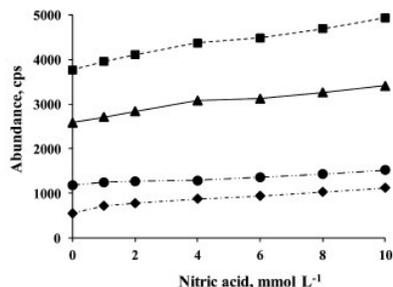


Figure 1. Effect of nitric acid on ICP-MS m/z 47 signal for (◆) deionized water; (●) potassium phthalate, 5 mmol L⁻¹; (▲) 25 μ g P L⁻¹ as P(V) in potassium phthalate, 10 mmol L⁻¹; and (▲) phosphorus-phthalate signal.

were applied in this experiment for better clarity of presentation (Table 1). As can be observed, the increasing concentration of nitric acid caused a gradual increase of signal for all three solutions tested. The net signal evaluated for phosphate standard (25 μ g P L⁻¹) rose from 2517 cps in the absence of acid to 3260 cps for its concentration of 10 mmol L⁻¹ (30% increase) and, most importantly, this signal remained relatively stable in the concentration range of 4–8 mmol L⁻¹ nitric acid (3092 \pm 73 cps), indicating that this range can be safely used in chromatographic separation for phosphorus detection at m/z 47.

The next task was to set appropriate instrumental conditions for the detection of elemental and oxide ions in the presence of mobile phase. For m/z 31, the tuning settings and collision/reaction cell conditions were adopted from the previous work (Table 1). To check for possible polyatomic interferences at m/z 47 (⁴⁷Ti⁺, ⁹⁴Zr²⁺, ⁷Li⁴⁰Ar⁺, ¹²C³⁵Cl⁺, ¹⁴N¹⁶O¹⁶O¹H⁺), the effect of He flow rate in the range from 0 to 4 mL min⁻¹ was examined for phosphate standard prepared in the mobile phase

and for blank (5 mmol L⁻¹ potassium hydrogen phthalate containing 8 mmol L⁻¹ nitric acid). As shown in Figure 2, the

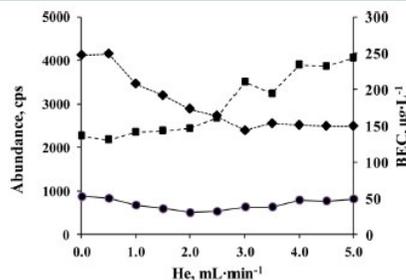


Figure 2. Effect of He flow rate in the octopole cell on ICP-MS signal at m/z 47: (■) BEC, μ g P L⁻¹; (◆) phosphate, 25 μ g P L⁻¹ in the mobile phase; (●) potassium phthalate in 8 mmol L⁻¹ nitric acid.

blank signal was always below 830 cps, the signal of phosphate standard solution (25 μ g P L⁻¹) decreased significantly at a gas flow rate of >0.5 mL min⁻¹, and background equivalent concentration (BEC) gradually increased, indicating no need for reaction/collision cell at m/z 47. Plasma operating conditions and QP focus, cell exit, and OcP bias voltages were refined by varying one parameter at a time under a criterion of the highest sensitivity (net signal for 10 μ g P L⁻¹ as phosphate, direct aspiration to ICP-MS). In this regard, forward plasma power was kept at 1500 W and octopole RF voltage at 100 V for both m/z values. A short residence time in plasma favors oxide formation, for which the makeup gas flow and the sampling depth were examined in the ranges of 0.1–0.8 mL min⁻¹ and 4–9 mm, respectively; the values finally chosen for oxide detection were 0.4 mL min⁻¹ and 8.5 mm (Table 1). Because the octopole cell was not pressurized with gas for m/z 47, the selected values for QP focus, cell exit, and OcP bias were different with respect to m/z 31 (Table 1). Finally, for setting voltages of the ion lenses, net signal for 10 μ g P L⁻¹ as P(V) was registered using three different values at cell entrance (-44, -36, and -30 V) while the two other parameters were varied according to the four-level factorial design. Specifically, the voltages tested were -180, -150, -100, and -50 V for extract 1 and -130, -120, -90, and -60 V for extract 2. The optimized response surfaces were evaluated using The Unscrambler software, and the obtained results revealed relatively higher P signal intensities for the cell entrance voltage -36 V as compared to -44 and -30 V. In Figure 3, the response surface for cell entrance -36 V is presented, and it can be observed that as low as possible voltage at extract 1 (-180 V) and as high as possible voltage at extract 2 (-60 V) would provide the best sensitivity of phosphorus detection at m/z 47. The tuning parameters finally selected are summarized in Table 1.

For chromatographic separation, a Hamilton PRP-X100 column with chemically inert polymeric support was selected with the expectation of better peak symmetry and lower ICP-MS baseline as compared to a silica-based column, in which silica and residual silanol groups present affinity to ionic species and, thus, may potentially affect the retention and column recovery of phosphorus oxyanions. In ion chromatography with conductivity detection, alkaline mobile phases have been

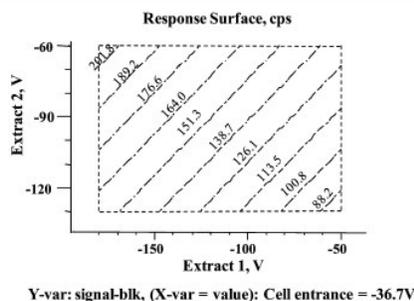


Figure 3. Response surface for net signal of $10 \mu\text{g P L}^{-1}$ as P(V) obtained at cell entrance voltage -36 , and variable voltages at extract 1 (-180 to -50 V) and extract 2 (-130 to -60 V).

typically used for separation of completely deprotonated phosphorus oxyanions;^{14,15} however, elevated pH values were avoided in this work to protect the components of the HPLC-ICP-MS system and, most importantly, for PO^+ detection/quantification, nitric acid had to be present in the mobile phase at the concentration of $4\text{--}8 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figure 1). Several authors reported separation of P oxyanions in the pH range from 2.5 to 4.0 with the mobile phases containing organic ions such as phthalate, succinate, malonate, and citrate.^{9,19,28,29} The single-charged H_2PO_4^- and H_2PO_3^- anions, as the primary species in such conditions,³⁰ would present lower retention with respect to double- or triple-charged anions and also shorter total chromatographic runs, especially advantageous when ICP-MS is to be used as the detection system. Because this technique does not tolerate high pH values, the intent was to apply low millimolar concentrations of potassium hydrogen phthalate/nitric acid mixture. To set the conditions enabling baseline separation of the two species in a short time and with good peak symmetry, several chromatograms for P(III) + P(V) standard mix were obtained, by varying the concentration of potassium hydrogen phthalate ($2\text{--}10 \text{ mmol L}^{-1}$) with pH adjusted by the addition of 1 mol L^{-1} nitric acid (pH 2.5–3.5) and testing different column flow rates ($0.6\text{--}1.5 \text{ mL min}^{-1}$) and temperatures (from room temperature up to 40°C). The finally selected conditions are listed under Materials and Methods; it should be noted that the concentration of nitric acid in the mobile phase was about 6 mmol L^{-1} (5 mmol L^{-1} hydrogen phthalate, pH 2.5), within the previously selected concentration range (Figure 1). In Figure 4, typical chromatograms of two mixed standard solutions are presented; the calibration results and typical figures of merit are summarized in Table 2. Even though baseline at m/z 47 was more elevated with respect to m/z 31, monitoring phosphorus oxide in the established chromatographic and ICP-MS conditions provided higher sensitivity, lower detection limits, and better short-term precision with respect to m/z 31 (Table 2). The detection limits evaluated as P concentration injected on column were comparable with those reported for LC-ICP-MS speciation of different phosphorus species and sample types^{18,19,22,31,32} yet significantly lower with respect to other procedures employed in the analysis of P oxyanions in plants.^{7–9,16} As described under Materials and Methods, a 50 mg aliquot of biomass was treated with 1 mL of extracting solution, and the obtained extract was diluted up to 20 times before its introduction to the

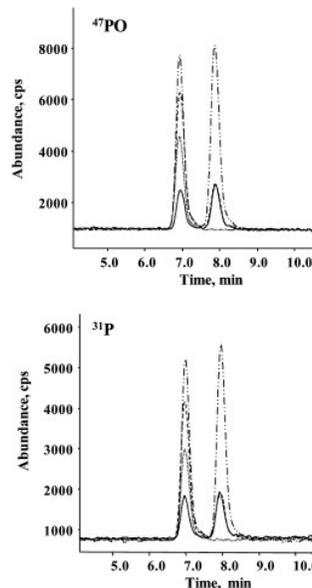


Figure 4. HPLC-ICP-MS chromatograms obtained for (—) phosphate + phosphite standard mix, $250 \mu\text{g P L}^{-1}$ each; (---) phosphate + phosphite standard mix, $1000 \mu\text{g P L}^{-1}$ each; (· · ·) plant extract; (---) plant extract with P(III) + P(V) standard addition, $250 \mu\text{g P L}^{-1}$ each: (a) m/z 47; (b) m/z 31.

HPLC-ICP-MS system, for which the detection limits evaluated in plant biomass at m/z 31 were $0.82 \mu\text{g P g}^{-1}$ P(III) and $0.87 \mu\text{g P g}^{-1}$ P(V) and at m/z 47 were $0.70 \mu\text{g P g}^{-1}$ P(III) and $0.63 \mu\text{g P g}^{-1}$ P(V) (Table 2). These low values are important features of the procedure proposed here, because the quantitative evaluation of P(III) to P(V) conversion in transgenic plant becomes possible.

The real world samples analyzed were transgenic tobacco plants engineered for phosphite metabolism. In the first attempt, deionized water was used for extraction as reported elsewhere.^{4,11,12} To do so, 1 mL of water was added to 50 mg of the pooled biomass, the mixture was placed in an ultrasonic bath for 30 min at room temperature, and the obtained extract was further cleaned up on a C18 cartridge. It should be noted that aqueous extract presented green color and contained organic matter; therefore, it could not be introduced directly to the anion exchange column or to ICP-MS. The reversed phase SPE is a common approach for the elimination of organic sample components, and it has also been reported as a cleanup step in the determination of P oxyanions in plant materials.^{7,12} Afterward, the extract was filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ Supor membrane, certified for ion chromatography, for elimination of residual fine particles. Finally, the sample extract was 20 times diluted prior to the HPLC-ICP-MS procedure. In triplicate analysis using m/z 31 for phosphorus detection, phosphite was not detected in this sample ($<0.8 \mu\text{g P g}^{-1}$), and the concentration found for phosphate was $0.204 \pm 0.032 \text{ mg P g}^{-1}$. To examine the recovery of the procedure, $200 \mu\text{L}$ of phosphate and phosphite mixed standards (50 mg P L^{-1} each)

Table 2. Analytical Figures of Merit Evaluated for the Anion Exchange Separation of Phosphate and Phosphite with ICP-MS Detection at m/z 31 and m/z 47 (Mean Value, Standard Deviation, and CV Obtained for Five Replicates)

parameter	m/z 31		m/z 47	
	P(V)	P(III)	P(V)	P(III)
baseline ^a \pm SD, cps	521 \pm 17	576 \pm 20	832 \pm 29	858 \pm 24
t_{ret} \pm SD, min	6.95 \pm 0.03	7.90 \pm 0.04	6.95 \pm 0.03	7.90 \pm 0.04
calibration ^b	71.2c + 23	84.1c + 43	110.3c + 86.4	115.1c + 101
R ²	0.9994	0.9997	0.9997	0.9998
DL _c ^c μ g P L ⁻¹	2.18	2.04	1.58	1.74
DL _d ^d μ g P g ⁻¹	0.87	0.82	0.63	0.70
DL _e ^e nmol P g ⁻¹	28	26	20	23
QL _f ^f μ g P L ⁻¹	3.64	3.42	2.65	2.89
CV _g ^g %	1.0	1.1	0.7	0.7
CV _h ^h %	2.7	2.5	1.5	1.4
CV _i ⁱ %	3.9	3.7	2.1	2.2

^aAcquired in the elution region of each species. ^bc = concentration, μ g P L⁻¹. ^cDetection limit evaluated on the basis of six standard deviations of baseline measured in the elution region of the analyte. ^dDetection limit as referred to phosphorus mass per gram of biomass. ^eDL as nmol of each species (phosphite or phosphate) per gram of biomass. ^fQuantification limit evaluated on the basis of 10 standard deviations of baseline measured in the elution region of the analyte. ^gCoefficient of variation representing instrumental precision for 250 μ g P L⁻¹. ^hCoefficient of variation representing within-run precision for 250 μ g P L⁻¹. ⁱCoefficient of variation representing between-run precision for 250 μ g P L⁻¹.

Table 3. Quantification Results Obtained in the Analysis of Plant Samples by the Proposed Procedures with ICP-MS Detection at m/z 31 and 47^a

sample	external calibration		standard addition	
	P(III)	P(V)	P(III)	P(V)
		m/z 47, mg P g ⁻¹ (dw) \pm SD		
1	0.035 \pm 0.009	0.296 \pm 0.015	0.032 \pm 0.016	0.304 \pm 0.019
2	nd	0.266 \pm 0.012		0.270 \pm 0.023
3	nd	0.203 \pm 0.016		0.215 \pm 0.027
		m/z 31, mg P g ⁻¹ (dw) \pm SD		
1	0.025 \pm 0.010	0.274 \pm 0.024	0.028 \pm 0.015	0.289 \pm 0.031
2	nd	0.255 \pm 0.021		0.283 \pm 0.019
3	nd	0.179 \pm 0.017		0.202 \pm 0.024

^aMean concentration values with respective SD based on triplicate analysis of each biomass are presented.

and 800 μ L of deionized water were added to another portion of this same pooled sample, and the results obtained were 0.193 \pm 0.020 mg P g⁻¹ for P(III) and 0.368 \pm 0.037 mg P g⁻¹ for P(V), indicating 96.5 and 82.0% recoveries for the two species, respectively. As already mentioned before, many metals form poorly soluble phosphates; therefore, in further development extraction was carried out with 10 mmol L⁻¹ EDTA at pH 8 for complexation of metal ions (principally Ca and Mg) and so to improve the extraction yield of P(V). An alkaline solution of EDTA (0.1 mol L⁻¹ EDTA in 0.25 mol L⁻¹ NaOH) is typically used for efficient extraction of phosphorus from soil (16 h in agitation);³³ however, lower concentrations of EDTA (<50 mmol L⁻¹) and less alkaline conditions (pH 8–8.5) were used for the extraction of soil phosphate available to plants,^{34,35} and these milder conditions seemed suitable for the extraction of P oxyanions from tobacco biomass. The results obtained for this same pooled sample in the second experiment were 0.231 \pm 0.037 mg P g⁻¹ P(V) and P(III) not detected, whereas in the spiked sample 0.419 \pm 0.035 mg P g⁻¹ as P(V) and 0.197 \pm 0.028 mg P g⁻¹ as P(III) were found, yielding recovery values of 94.2 and 98.6% for the two species, respectively. On the basis of these results, EDTA extraction and a two-step purification procedure were applied in further analyses.

In Figure 4, the chromatograms acquired at m/z 31 and 47 for plant extract (sample 3) and for the spiked sample are presented. Specifically, 100 μ L of the mixed standard solution

(50 mg P L⁻¹ P(III) and 50 mg P L⁻¹ P(V)) was added to the 50 mg sample aliquot, which means that after extraction, cleanup, and dilution, the standard addition resulted in the concentration 250 μ g P L⁻¹ of each species in the final solution. In Figure 4, chromatograms of two calibration solutions are also included, which enables confirmation of species identity. It can also be observed that the baseline for m/z 31 was lower as compared to m/z 47; however, it presented higher noise, in agreement with Figures 1 and 2 and Table 2. Three samples from different plants were analyzed, and the results obtained for the detection at two m/z values were in good agreement; however, monitoring phosphorus oxide ion resulted in better precision as compared to elemental ion (Table 3). Indeed, the relative standard deviation for P(V) determination was around 5% for m/z 47 and 9% for m/z 31 (Table 3). For accuracy checking, the determination was accomplished by a two-point standard addition (250 and 500 μ g P L⁻¹ of two species in the solution injected to the chromatographic system). The quantitative results were in good agreement with those obtained by external calibration (Table 3). In samples 2 and 3, only phosphate was found, whereas in sample 1 low phosphite concentration was also present. Biological interpretation of analytical data is out of scope; however, it should be noted that the results obtained in this work were consistent with those previously reported for these same transgenic plants.⁵ In particular, samples 1–3 corresponded to plants

grown in phosphite as a sole P source, and the speciation results confirmed efficient oxidation of P(III) to P(V) by plant.

In conclusion, the feasibility of phosphorus monitoring at m/z 47 for the determination of phosphite and phosphate in plant material by anion exchange chromatography with ICP-MS detection has been demonstrated. In this procedure, potassium phthalate mobile phase containing a millimolar concentration of nitric acid enabled baseline resolution of the two element species within 10 min and favored the formation of phosphorus oxide ions in plasma. The results obtained in the analysis of transgenic plants using two detection modes (m/z 31 and 47) were in good agreement; however, phosphorus oxide monitoring yielded a slightly lower detection limit and better precision. Most importantly, the collision/reaction cell was not needed for phosphorus oxide ion monitoring, for which the procedure can be accomplished on any ICP-MS instrument. Many biotechnological studies focus today on phosphite as an alternative phosphorus source for plants; because phosphite utilization relies on its *in vivo* oxidation to phosphate, the implementation of the proposed procedure would provide useful, complementary analytical information in such studies.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* (Kazimierz Wrobel) E-mail: kazimierz@ugto.mx. Phone: (+52) 473 7327555. Fax: (+52) 473 7326252.

Funding

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

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Luis Herrera-Estrella from the National Laboratory of Genomics for Biodiversity at CINVESTAV for providing transgenic plant samples.

■ REFERENCES

- Chien, S.; Prochnow, L.; Tu, S.; Snyder, C. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **2011**, *89*, 229–255.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Sci. Plant Nutr.* **2009**, *55*, 228–234.
- Avila, F. W.; Faquin, V.; Lopes Araujo, J.; Marques, D. J.; Martins Ribeiro, P., Jr.; Klynger da Silva, L.; Junio Ramos, S.; Pereira Baliza, D. Phosphite supply affects phosphorus nutrition and biochemical response in maize plants. *Aust. J. Crop Sci.* **2011**, *5*, 646–653.
- Ratjen, A. M.; Gerendas, J. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2009**, *172*, 821–828.
- Lopez-Arredondo, D. L.; Herrera-Estrella, L. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 889–893.
- Danova-Alt, R.; Dijkema, C.; De Waard, P.; Koeck, M. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells – kinetic and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies. *Plant Cell Environ.* **2008**, *31*, 1510–1521.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Pears, S. J.; Lambers, H.; Finnegan, P. M.; Hardy, G. E. S. J.; O'Brien, P. A. An enzymatic fluorescent assay for the quantification of phosphite in a microtiter plate format. *Anal. Biochem.* **2011**, *412*, 74–78.
- Roos, G. H. P.; Loane, C.; Dell, B. Facile high performance ion chromatographic analysis of phosphite and phosphate in plant samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1999**, *301*, 2323–2329.
- Smillie, R. H.; Grant, B. Determination of phosphate and phosphite in plant material by gas chromatography-mass spectrometry and ion chromatography. *J. Chromatogr.* **1988**, *455*, 253–261.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruvindis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil* **2008**, *308*, 1–10.
- Brett, P.; Barron, L.; Nesterenko, P. The determination of phosphates in environmental samples by ion chromatography. *Chromatographic Analysis of the Environment*, 3rd ed.; Chromatographic Science Series 93; Taylor and Francis: New York, 2006; pp 263–286.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Voelkanode* **2006**, *56*, 87–99.
- Noack, S. R.; McLaughlin, M. J.; Smernik, R. J.; McBeath, T. M.; Armstrong, R. D. Crop residue phosphorus: speciation and potential bio-availability. *Plant Soil* **2012**, *359*, 375–385.
- Han, C.; Geng, J.; Xie, X.; Wang, X.; Ren, H.; Gao, S. Determination of phosphite in a eutrophic freshwater lake by suppressed conductivity ion chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 10667–10674.
- Ivey, M. M.; Foster, K. L. Detection of phosphorus oxyanions in synthetic geothermal water using ion chromatography–mass spectrometry techniques. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1098*, 95–103.
- Pilbeam, R. A.; Colquhoun, L. J.; Shearer, B. B.; Hardy, G. E. S. J. Phosphite concentration: its effect on phytotoxicity symptoms and colonisation by *Phytophthora cinnamomi* in three understorey species of *Eucalyptus marginata* forest. *Australasian Plant Pathol.* **2000**, *29*, 86–95.
- Sadi, B. B.; Vonderheide, A. P.; Caruso, J. A. Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1050* (1), 95–101.
- Chen, Z.; He, W.; Beer, M.; Megharaj, M.; Naidu, R. Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octapole reaction system. *Talanta* **2009**, *78*, 852–856.
- Guo, Z. X.; Cai, Q.; Yang, Z. G. Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 160–167.
- Valls-Cantenys, C.; Iglesias, M.; Todoli, J. L.; Salvado, V. Speciation of phosphorus oxoacids in natural and waste water samples. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1231*, 16–21.
- Shah, M.; Caruso, J. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: recent trends in phosphorus speciation. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1969–1984.
- Wrobel, K.; Landero Figueroa, J. A.; Zaina, S.; Lund, G.; Wrobel, K. 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*, 609–614.
- Smith, C. J.; Wilson, I. D.; Weidolf, L.; Abou-Shakara, F.; Thomsen, M. Enhanced detection of sulphur and phosphorus containing compounds in HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry using chemical resolution via hexapole-based reaction with oxygen. *Chromatographia* **2004**, *59*, S165–S170.
- Diez, F. S.; Sugishima, N.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5851–5857.
- Persson, D. P.; Hansen, T. H.; Laursen, K. H.; Schjoerring, J. K.; Husted, S. Simultaneous iron, zinc, sulfur and phosphorus speciation

analysis of barley grain tissues using SEC-ICP-MS and IP-ICP-MS. *Metallomics* **2009**, *1*, 418–426.

(26) Civardelli, D.; Sacchetta, P.; Federici, G.; Di Ilio, C.; Urbani, A. Protein phosphorylation stoichiometry by simultaneous ICP-QMS determination of phosphorus and sulfur oxide ions: a multivariate optimization of plasma operating conditions. *Talanta* **2010**, *80*, 1513–1525.

(27) Kovacevic, M.; Goessler, W.; Mikac, N.; Veber, M. Matrix effects during phosphorus determination with quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 145–151.

(28) Alcazar, A.; Fernandez-Caceres, P. L.; Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G. Ion chromatographic determination of some organic acids, chloride and phosphate in coffee and tea. *Talanta* **2003**, *61*, 95–101.

(29) Sunil, R. P.; Babu, K. S.; Kumar, N.; Balakrishna, P. A validated stability indicating ion exchange method for the quantification of alendronate, phosphite and phosphate in alendronate sodium tablets and analysis of in-vitro dissolution samples. *J. Chilean Chem. Soc.* **2012**, *57*, 1232–1236.

(30) Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Foster, K. L. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: significance, speciation and determination. *Talanta* **2005**, *66*, 435–444.

(31) Camp, C. L.; Sharp, B. L.; Reid, H. J.; Entwisle, J.; Goenaga Infante, H. Analysis of mono-phosphate nucleotides as a potential method for quantification of DNA using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 367–372.

(32) Munoz, J. A.; Lopez-Mesas, M.; Valiente, M. Minimum handling method for the analysis of phosphorus inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) in urine by SPE-ICP techniques. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *658*, 204–208.

(33) Cade-Menun, B. J.; Preston, C. M. A comparison of soil extraction procedures for P-31 NMR spectroscopy. *Soil Sci.* **1996**, *161*, 770–785.

(34) Ahmed, B.; Islam, A. Use of sodium EDTA as an extractant for determining available phosphate in soil. *Geoderma* **1975**, *14*, 261–265.

(35) Demaria, P.; Flisch, R.; Frossard, E.; Sinaj, S. Exchangeability of phosphate extracted by four chemical methods. *J. Plant Nutr. Sci.* **2005**, *168*, 89–93.