

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

**CAMPUS GUANAJUATO**

**División de Ciencias Naturales y Exactas**

**Posgrado en Química**



**“EMPLEO DE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ESTUDIO METABOLÓMICO DE DIVERSOS ORGANISMOS BAJO ESTRÉS AMBIENTAL.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA**

**PRESENTA**

**M.C. Alan Alexander González Ibarra**

## Contenido

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1 Definición de la metabolómica. ....	3
1.2 Enfoques de la metabolómica. ....	4
1.3 Aplicación de la metabolómica en distintos sistemas. ....	5
1.3.1 La metabolómica en los alimentos. ....	5
1.3.2 La metabolómica en plantas. ....	6
1.3.3 La metabolómica en los microorganismos. ....	9
1.3.4 Metabolómica en biofluidos.....	11
1.4 Análisis Instrumental.....	14
1.4.1 Espectrometría de masas ....	15
1.4.2 Fuentes de ionización. ....	16
1.4.3 Guía de iones. ....	20
1.4.4 Separadores másicos ....	21
1.4.5 Acoplamientos de MS con técnicas de separación.....	25
2. Objetivos. ....	28
2.1. Objetivo general.....	28
2.2. Objetivos particulares ....	28
3. Parte experimental.....	28
3.1 Equipo de laboratorio.....	28
3.1.1 Instrumentación analítica. ....	28
3.1.2 Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos.....	29
3.2 Estándares y reactivos. ....	29
3.3 Programas de análisis de datos.....	29
3.4 Material biológico ....	30
4. Resultados y discusión. ....	30
4.1 Estudio del efecto de estrés abiótico impuesto por el Cr(VI) sobre el perfil de aminoácidos en <i>B. cereus</i> . ....	30
4.1.1 Introducción. ....	30
4.1.2 Objetivo particular.....	31
4.1.3 Condiciones experimentales.....	31
4.1.4 Resultados y discusión. ....	33

4.1.5 Conclusiones .....	37
4.2 Determinación de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina en diferentes matrices químicas por cromatografía de alta resolución acoplada mediante electro nebulización a espectrometría de masas con trampa de iones utilizando monitoreo de reacciones múltiples (HPLC-ESI-ITMS/MS).....	38
4.2.1 Introducción. ....	38
4.1.2 Objetivo particular.....	41
4.1.3 Condiciones experimentales.....	41
4.1.5 Resultados y discusión. ....	42
4.1.6 Conclusiones. ....	55
4.3 Cambio en el perfil metabólico en <i>Helianthus annuus</i> bajo exposición a Cr(VI) estudiado por medio de capHPLC-ESI-QTOF-MS/MS .....	56
4.3.1 Introducción. ....	56
4.3.2 Objetivos particulares.....	59
4.3.3 Condiciones experimentales.....	59
4.3.4 Resultados y discusión. ....	62
4.3.5 Conclusiones .....	76
4.4. Evaluación del efecto de Cr(VI) sobre la ruta del ácido linoleico en raíz de girasol, mediante herramientas de metabolómica.....	77
4.4.1 Introducción. ....	77
4.4.2 Objetivos particulares.....	78
4.4.3 Condiciones experimentales.....	78
4.4.4 Resultados y discusión. ....	81
4.4.5 Conclusiones. ....	92
5. Conclusiones .....	92
6. Bibliografía. ....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración del análisis de analitos en fase condensada mediante ionización suave y espectrometría de masas.....	16
Figura 2. Orientación de los planos en un arreglo de cuadrupolo.....	24
Figura 3. Típico cromatograma GC-MS (TIC, m/z 60-300) obtenido en el análisis de muestras de biomasa de <i>B. cereus</i> control después de la derivatización con metil cloroformiato.....	33
Figura 4. Espectros de masas de a) estándar de valina, b) mezcla de las muestras de <i>B. cereus</i> control ( <sup>15</sup> N) plus cultivo con 0 mg/L de Cr(VI) ( <sup>14</sup> N), c) mezcla de muestra control con el cultivo expuesto a 5 mg/L de Cr(VI) en <sup>14</sup> N.....	34
Figura 5. Representación gráfica del efecto de diferentes concentraciones de Cr(VI) sobre el cambio de la concentración de aminoácidos libres en cultivo de <i>B. cereus</i> . Se presentan los resultados promedio junto con la desviación estándar evaluados con base en tres réplicas...	37
Figura 6. Estructuras de las poliaminas analizadas.....	39
Figura 7. Patrones isotópicos experimentales y teóricos de las moléculas completamente derivatizadas protonadas (panel izquierdo) y los respectivos patrones de fragmentación (panel derecho) obtenidos por infusión directa de los estándares al sistema ESI-QTOFMS y MS/MS.....	45
Figura 8. Intensidades de las dos transiciones más abundantes en cada estándar contra las diferentes amplitudes de fragmentación evaluadas. ....	46
Figura 9. Típico cromatograma de una mezcla de estándares (250 ng de cada poliamina) obtenido en modo MRM (panel izquierdo) y el espectro de fragmentación obtenidos en HPLC-ESI-ITMS.....	48
Figura 10. Concentración de las cuatro poliaminas encontradas en <i>L. sativum</i> desarrollada en presencia de diferentes concentraciones de Cd(II) adicionadas al medio de crecimiento. (Se presentan las medias con su respectivo SD, n=3; valores de <i>p</i> fueron obtenidos por la comparación de las medias obtenidas en presencia de Cd(II) respecto plantas no-expuestas).....	52
Figura 11. Cromatogramas de pico base obtenidos para los extractos de raíz expuestos a Cr(VI) (azul) y para el control, plantas no expuestas (rojo). Se muestran dos réplicas técnicas para cada una de las dos muestras.....	63

Figura 12. Análisis de los datos obtenidos en LC-MS para generación de la lista de precursores: (a) gráfica de nubes generada en XCMS con los siguientes parámetros: Intensidad  $>5 \times 10^4$ ; relación de cambio  $\geq 5$ ;  $p \leq 0.01$ . (b) Gráfica de volcán obtenido con ProfileAnalysis con los siguientes parámetros: razón de cambio  $\geq 5$ ;  $p \leq 0.01$ .....64

Figura 13. Impresión de la pantalla SIRIUS que muestra los resultados obtenidos para el precursor 231.1367 m/z; se muestra el espectro MS/MS experimental, árbol de fragmentación, y las primeras 4 formulas con su respectivo puntaje.....66

Figura 14. Impresión de la pantalla de MS-Finder donde se muestran los resultados para el ion precursor m/z 231.1367. El patrón isotópico y los espectros de MS/MS experimentales (azul) y teórico (rojo) se muestran juntos. La lista de posibles fórmulas con su error de masa y puntaje son presentadas y para la formula seleccionada; también se presentan las posibles estructuras sugeridas por búsqueda en las bases de datos.....66

Figure 15. Primeras tres formulas sugeridas mediante plataformas SIRIUS y MS-Finder para los siete precursores (las puntuaciones son reportadas en paréntesis, los recuadros en gris indican la fórmula escogida para la asignación de estructuras. En el panel derecho se muestran, los cromatogramas de ion extraído adquiridos para las dos replicas biológicas de plantas expuestas y no expuestas a Cr(VI).....72

Figura 16. Gráfica de barras de las medias de la concentración de Cr en las muestras con su respectiva desviación estándar para cada uno de los grupos.....81

Figura 17. PCA de los datos obtenidos de la raíz (izquierda) y de la parte aérea (derecha) del girasol. Las unidades se encuentran en unidades de varianza y están centrados.....82

Figura 18. Efecto de la concentración de Cr(VI) en medio de cultivo sobre la abundancia de primeras seis características moleculares asignadas a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En las leyendas de las gráficas, se anota la masa nominal del ion seguida por su tiempo de retención. Se presentan valores de medias con respectivas desviaciones estándar, evaluadas para cuatro replicas (2 biológicas y dos técnicas).....84

Figura 19. Efecto de la concentración de Cr(VI) en medio de cultivo sobre la abundancia de restantes seis características moleculares asignadas a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En las leyendas de las gráficas, se anota la masa nominal del ion seguida por su tiempo de retención. Se presentan valores de medias con respectivas desviaciones estándar, evaluadas para cuatro replicas (2 biológicas y dos técnicas).....85

Fig. 20. Cromatogramas extraídos de iones correspondientes a siete de las características moleculares de la Tabla 10, los EIC se obtuvieron a partir del TIC de extracto de raíz expuesto a 25 mg/L Cr(VI). Para cada ion extraído se presenta su estructura sugerida.....89

Figura 21. Ruta metabólica del ácido linoleico en girasol ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?han00591](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?han00591)) marcando compuestos asignados a las características moleculares de la tabla 12.....90

Figura 22. Empalme de los tres cromatogramas de conteo total de iones (TIC) de las muestras de ácido linoleico (3.75 mg/L) con dos distintas concentraciones de Cr(VI) (50 y 150 mg/L).....92

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo mínimo.....	31
Tabla 2. Condiciones del GC-MS para el análisis de aminoácidos después de su derivatización con metil cloroformiato.....	32
Tabla 3. Relación de las intensidades de los iones característicos (con nitrógeno en su estructura) de los aminoácidos encontrados en las muestras.....	35
Tabla 4. Prueba de Tukey (nivel de confianza 95%). La misma letra para diferentes concentraciones indica que no se encontró una diferencia significativa entre ellas.....	36
Tabla 5. Parámetros establecidos para la cuantificación de poliaminas por monitoreo de reacciones múltiples (MRM).....	47
Tabla 6. Funciones de regresión lineal evaluadas para seis procesos de calibración independiente y los límites de cuantificación y detección.....	49
Tabla 7. Parámetros de validación para el procedimiento propuesto para la aplicación en extractos de plantas.....	51
Tabla 8. Parámetros de validación para el procedimiento propuesto para la aplicación en orinas.....	54
Tabla 9. Concentraciones de poliaminas (ng/mL) encontradas en muestras de orina de personas saludables, pacientes diabéticos sin complicaciones y pacientes diabéticos con severas complicaciones (seis sujetos por grupo, n=3).....	55
Tabla 10. Lista de precursores y formulas moleculares aceptadas.....	65
Tabla 11. Las tres primeras estructuras obtenidas de las fórmulas de los siete precursores...	73
Tabla 12. Primeras 10 rutas metabólicas con mayor número de características moleculares asociadas a estas.....	82
Tabla 13. Composición elemental mejor puntuada utilizando SIRIUS (S) y MS-Finder (MF) para cada característica molecular con su tiempo de retención (TR).....	86
Tabla 14. Tabla con las primeras tres estructuras mejor puntuadas (Rank) para CSI:FingerID (IF) y MS-Finder (MF) para las doce características moleculares.....	87

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ac	Corriente alterna
APCI	Ionización química a presión atmosférica
CAD	dicloruro de cadaverina
capHPLC-ESI-QTOF	Cromatografía de líquidos capilar acoplado a un cuadrupolo con tiempo de vuelo por medio de electro nebulización como fuente de ionización
CI	Ionización química
cps	Cuentas por segundo
Da	Dalton
dc	Corriente directa
DL	Límite de detección
DMSO	Dimetil sulfoxido
EI	Electroionización
ESI	Ionización por electro nebulización
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electro nebulización
FNBT	4-fluoro-2-nitro-1-(trifluoromethyl)benzene
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC-ESI-ITMS	Cromatografía de líquidos acoplado a una trampa de iones por medio de electro nebulización como fuente de ionización
ICP-MS	Espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente
IS	Estándar interno
ITCs	Isotiocianatos orgánicos
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Mass spectrometry/mass spectrometry
ODC	Ornitina descarboxilasa
PA's	Poliaminas
PUT	Dicloruro de putrescina
QL	Límite de cuantificación
rf	Radio frecuencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SPD	trihidrocloruro de espermidina
SPM	tetrahidrocloruro de espermina
SSE	Supresión/mejora de señal
TIC	Conteo total de iones
TOF	Tiempo de vuelo

UHPLC

Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución

## RESUMEN

La metabolómica tiene como objetivo estudiar todas aquellas moléculas orgánicas de baja masa molecular (hasta 1.5 KDa) que participan en el metabolismo de organismos vivos; este estudio puede ser efectuado sobre sistemas dinámicos o sobre tejidos u órganos y de manera cuantitativa o cualitativa.

El capítulo 1 de esta tesis es una introducción general en la que en una primera instancia se define a la metabolómica, dentro de esta definición se habla de los dos enfoques más extendidos; el “targeted metabolomics” que tiene que ver con un análisis dirigido hacia metabolitos específicos y generalmente cuantitativo y, por otro lado, el “untargeted metabolomics” que es un análisis no dirigido el cual consiste en obtener perfiles metabólicos bajo ciertas características para compararlos contra controles u otros grupos y regularmente es de carácter cualitativo. También, se hace una breve revisión sobre los sistemas más estudiados como lo son las bacterias, plantas, biofluidos; junto con sus aplicaciones como lo son en el área de los alimentos, la medicina y la ingeniería química. Finalmente se habla sobre la plataforma instrumental más utilizada en el área de la metabolómica como lo es la cromatografía acoplada a la espectrometría de masas, desglosando de manera muy breve los tipos de acoplamientos de diferentes sistemas cromatográficos con los distintos analizadores másicos.

En el capítulo 2 se exponen los objetivos del trabajo. La tesis ha sido enfocada en el desarrollo de procedimientos para llevar a cabo análisis metabolómicos en diferentes tipos de organismos usando como base la plataforma de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases y líquidos y un abanico de programas de análisis de datos.

En el capítulo 3 se presenta una lista de equipos, materiales, reactivos y programas de análisis de datos, empleados durante este proyecto.

En el capítulo 4.1 se describe un estudio dirigido a la influencia que el estrés abiótico inducido por Cr(VI) tiene sobre el metabolismo de aminoácidos en la bacteria *Bacillus cereus*. Para esto se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con electroionización. Para darle un carácter volátil, los aminoácidos

fueron derivatizados con cloroformatos y el grupo control fue marcado diferencialmente con  $^{15}\text{N}$  in vivo.

En 4.2 se continua con el enfoque de “targeted metabolomics” donde el grupo de metabolitos a analizar son poliaminas biogénicas (putrescina, cadaverina, espermidina y espermina); para que estos compuestos puedan ser retenidos en una columna C18 son derivatizados con FNBT y analizados por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas con trampa de iones por medio de ESI en modo positivo. El objetivo del trabajo fue el de desarrollar un procedimiento para cuantificar estas poliaminas en diferentes matrices químicas. Se evaluó orina de personas con y sin diabetes; con y sin complicaciones, además se evaluó *Lepidium sativum* bajo estrés impuesto por Cd(II).

Un enfoque de “untargeted metabolomics” se utilizó en el capítulo 4.3. La planta *Helianthus annuus* fue sometida a estrés del Cr(VI) utilizando una concentración de 25 mg/L en medio Hoagland (usado para su crecimiento) y el perfil de Cr en la raíz y en la parte aérea fue comparado con un grupo control el cual se creció de igual manera en medio Hoagland pero en ausencia de Cr(VI). Los resultados señalaron una mayor concentración de Cr (ICP-MS) en la raíz por lo que se evaluaron los perfiles metabólicos de esta parte de la planta. Para este análisis se utilizó un sistema capHPLC-ESI-QTOF, una vez obtenidos los datos, fueron procesados en XCMS en línea junto con ProfileAnalysis donde se obtuvieron una lista de precursores de los que se obtuvieron los espectros de MS/MS; estos espectros fueron procesados en los programas SIRIUS y MS-Finder en un intento de identificación de los metabolitos cuya concentración cambió de manera significativa bajo estrés inducido por Cr(VI).

Una vez más se utilizó la planta de girasol (*Helianthus annuus*) para el estudio sobre el estrés causado por Cr(VI) en la sección 4.4. Se formaron cuatro grupos sometidos a diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 1, 5, y 25 mg/L). Como en el apartado anterior, la planta fue segmentada en raíz y parte aérea para después ser liofilizada. La extracción de los metabolitos se llevó a cabo con 1 mL de una solución de 80% de metanol en agua para 25 mg de biomasa. Se utilizó el sistema capHPLC-ESI-QTOFMSMS en modo de ionización negativo. Los datos obtenidos fueron tratados en XCMS-online, en el cual el algoritmo mummiching arrojó una serie de rutas metabólicas representadas en los datos LC-MS por características moleculares

con cierto grado de coincidencia con metabolitos pertenecientes a estas rutas. Entre las rutas de alta coincidencia se encontró la biosíntesis de ácidos grasos polihidroxiados con 12 metabolitos detectados entre 14 pertenecientes a la ruta. Para aportar evidencia sobre la identidad de estos metabolitos, se obtuvieron espectros MS/MS de las doce características moleculares utilizando SIRIUS y MS-Finder, obteniéndose probables estructuras químicas. Los metabolitos - productos de oxidación del ácido linoleico fueron encontrados con abundancias más altas en presencia de Cr(VI) respecto a las plantas controles, con una tendencia de incremento conforme aumentaba la concentración del agente estresante en el medio. Mediante experimentos in vitro, se ha demostrado la formación de típicos productos de oxidación del ácido linoleico cuando éste se puso en contacto con Cr(VI), lo que confirma que el ion cromato participa directamente en la oxidación de lípidos.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a una serie de conclusiones generales que se presentan en el capítulo 5.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

### 1.1 Definición de la metabolómica.

El término “omics” proviene del latín “ome” que significa muchos y se refiere a un estudio basado en un gran número de mediciones; en primera instancia este término fue utilizado en el contexto de genómica. Hoy en día, en diferentes áreas de la ciencia e ingeniería, los “omics” se enfocan en: (1) mapeo de información referente a objetos tales como genes, proteínas, lípidos, metabolitos, iones, etc.; (2) búsqueda de relaciones y posibles interacciones entre los objetos dentro de un “ome” específico; (3) elucidación de mecanismos de regulación de dichas relaciones/interacciones para su manipulación; (4) integración de diferentes “omes” en “omics” generalizados. Dentro de este panorama general, el presente trabajo se centra en metabolómica[1].

La metabolómica, desde una perspectiva muy general, se refiere a un análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos que ayuden a entender un sistema llámese células, tejidos, organismos u órganos[2]. El objeto de estudio de la metabolómica lo denominaremos

metabolóma que es la colección cualitativa y cuantitativa de todas las moléculas de baja masa molecular presentes en una célula, que participan en reacciones metabólicas generales y que son requeridas para el mantenimiento, crecimiento y funcionamiento normal de este sistema. Generalmente, el metabolóma incluye especies como aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y lípidos. La complejidad del estudio del metabolóma resulta evidente ya que éste está conformado por una gran cantidad de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas y en diferentes concentraciones.

## 1.2 Enfoques de la metabolómica.

Con el fin de darle solución al problema que el estudio del metabolóma representa, se han generado diversos enfoques; dos de ellos son “untargeted metabolomics” o metabolómica sin objetivo y “targeted metabolomics” o metabolómica con objetivo. El primero de ellos es un análisis global de todos los metabolitos encontrados bajo ciertas condiciones, por ejemplo, el tipo de extracción de los metabolitos, las técnicas de separación y detección, etc.[3]. El segundo de ellos es un análisis cuantitativo dirigido a un grupo de metabolitos conocidos y relacionados entre sí; se suelen utilizar estándares para conocer el tiempo de retención en columnas cromatográficas, su relación de masa/carga ( $m/z$ ) y para cuantificar[4]. Evidentemente, la cantidad y el tipo de información generada en uno y otro enfoque son diferentes; mientras que en el primer enfoque se busca obtener la mayor cantidad de información posible para abundar en lo que pudieran ser aspectos desconocidos del metabolismo de dicho sistema, en el otro enfoque la información se limita solo a un grupo de metabolitos conocidos y con características similares. Aunque los dos enfoques mencionados anteriormente abarcan la mayoría de los estudios, se han formulado algunos otros más puntuales; “fingerprinting” que corresponde a “untargeted metabolomics”, “footprinting” que involucra el intercambio de metabolitos entre el sistema y el medio, “Profiling” engloba el análisis de un grupo de metabolitos con similitud química junto con sus estándares, “Flux analysis” es el rastreo de un analito a través de una o más rutas metabólicas y “Target analysis” que ya se explicó anteriormente[5].

Bajo todas estas estrategias se han desarrollado diferentes aplicaciones que brevemente se mencionan a continuación: [6]:

- Determinación de biomarcadores metabólicos que aparecen o cambian sus concentraciones, funcionando como indicadores de la presencia de una enfermedad o en respuesta a tratamientos basados en fármacos.
- Determinación del efecto de estrés medioambiental o bioquímico sobre plantas o microorganismos los cuales pueden incluir modificaciones genéticas.
- Caracterización de microorganismos.
- Valoración de la salud en humanos.
- Ingeniería metabólica.

Los métodos analíticos, así como la instrumentación empleada juegan un papel fundamental en los resultados y la cantidad de información que se pueda obtener, así como su aplicabilidad y viabilidad. Todo esto será discutido más adelante.

### 1.3 Aplicación de la metabolómica en distintos sistemas.

#### 1.3.1 La metabolómica en los alimentos.

Bajo este panorama general de lo que es la metabolómica y las herramientas utilizadas en esta área, se han desarrollado distintas aplicaciones. El área de los alimentos no queda fuera de este contexto puesto que se han desarrollado tres áreas de interés: seguridad alimenticia, calidad y trazabilidad[7].

En seguridad alimenticia se han hecho estudios para detección y cuantificación de especies químicas que pudieran poner en riesgo la salud del consumidor como, por mencionar solo algunos ejemplos, se han realizado análisis de antibióticos en matrices como carne, leche y miel[8, 9], contaminantes halogenados e hidrocarburos policíclicos aromáticos en almejas y mejillones[10], herbicidas en alimentos provenientes de plantas[11], entre otros.

En el área de la calidad alimenticia, la composición, la información nutrimental, el procesamiento y almacenaje de los alimentos, entre otros aspectos son de gran interés por la relación que guardan los alimentos con la salud de quien los consume. Por esta razón se han realizado distintos tipos de análisis para evaluar cada una de estas aristas. En el mercado uno de los principales problemas es la adulteración de alimentos, se han aplicado fundamentos y herramientas de metabolómica con el fin de encontrar marcadores de adulteración o de

identidad. Entre varios ejemplos representativos, se han analizado una serie de jugos de frutas con UHPLC-ESI-QTOF en combinación con el análisis multivariable con el objetivo de encontrar modelos que permitan identificar rápidamente bebidas adulteradas[12].

Otro punto importante es la trazabilidad de los alimentos, la cual se enfoca en dos puntos; el procesamiento de los alimentos y el origen geográfico de estos. El principal enfoque que se le da al estudio de origen geográfico es un análisis “untargeted” en el que por lo general se involucra cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y, para el análisis de datos, herramientas estadísticas multivariadas en donde los análisis suelen ser de carácter discriminatorio y/o predictivo. El otro enfoque tiene que ver con asegurar que el alimento conserve sus propiedades nutritivas aún después del procesamiento, además de identificar posibles contaminantes añadidos durante este proceso.

### 1.3.2 La metabolómica en plantas.

Las plantas son organismos de vital importancia para el humano debido a que son una gran fuente de alimento ya sea de manera directa o indirecta (como alimento para ganado), además de su uso en la medicina tradicional. El estudio de su metaboloma es esencial ya que nos puede proveer de evidencias acerca del/los fenotipo/s necesario/s para que una planta se desarrolle bajo ciertas condiciones, así como dar información sobre los metabolitos que tienen algún efecto terapéutico y con ello desarrollar la mayor cantidad de aplicaciones posibles. Una de las aplicaciones más prometedoras es la de inducir la expresión de ciertos metabolitos para incrementar el valor nutritivo o efectos sobre la salud[13].

Algunos de los compuestos de baja masa molecular que generalmente juegan el papel en defensa del organismo en condiciones de estrés, se denominan metabolitos secundarios; a diferencia del producto del metabolismo primario históricamente han sido considerados como no esenciales. Sin embargo, estos tienen diversas funciones en las plantas que tienen que ver con su supervivencia y tienen como una de sus características principales el de estar restringidos a grupos particulares de plantas. Esto es, el genoma de las plantas contiene de 20000 a 60000 genes de los cuales solo del 15 al 25% de ellos codifican para enzimas que tienen que ver con el metabolismo secundario pero solo una parte de estos llevan a la

producción de metabolitos secundarios dependiendo del género, familia o hasta especie a la que pertenece la planta[14].

Bajo este contexto, los metabolitos secundarios constituyen una clase de compuestos altamente valiosos debido a sus posibles aplicaciones en el campo de la salud, la agricultura y de los alimentos. Así, se puede plantear dos vertientes en cuanto al estudio de los metabolitos secundarios en plantas; uno dirigido hacia el estudio de la capacidad de reestablecer una homeostasis del estado redox y otra vertiente que tiene que ver con una acción biológica o farmacológica.

Un ejemplo del primer enfoque es el estrés abiótico ocasionado por los metales pesados. En este escrito definiremos los metales pesados en términos de su toxicidad como elementos y sus compuestos debido a que hasta ahora no existe una definición oficial (IUPAC) de los límites de este término [15]. Así, podemos hablar principalmente de elementos como Pb, Cd, Cr y Hg entre otros con alto potencial tóxico para las plantas donde sus principales mecanismos de toxicidad pueden dividirse en los siguientes: a) Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), b) Bloqueo de grupos funcionales en biomoléculas y c) Sustitución de iones metálicos esenciales en sus sitios específicos [16].

Los compuestos de baja masa molecular que ayudan a mantener la homeostasis redox en las plantas son diversos, entre los más comunes son el ácido ascórbico, glutatión u otros tioles, tocoferol y algunos pigmentos como los carotenoides. Uno de los grupos de interés son los isotiocianatos orgánicos (ITCs), incluyendo bencilisotiocianato,  $\beta$ -feniletilisotiocianato y alilisotiocianato, que se manifiestan como metabolitos secundarios de plantas, especialmente de la familia de las *Brassicaceae*. Una vez formados los ITCs, estos reaccionan fácilmente con grupos tiol y amino presentes en biomoléculas, lo que se convierte en una importante vía de regulación de proteínas [17]. Como ejemplo, en el caso del xantohumol de *Humulus lupulus* han sido demostradas sus propiedades antioxidantes, quimiopreventivas y también su papel en la inhibición de enzimas ciclooxigenasas. Uno de los más importantes mecanismos para mantener el equilibrio es el sistema ascorbato y glutatión[18]. Otro grupo de compuestos que tienden a mantener el equilibrio redox son los compuestos fenólicos (fenoles, ácidos benzoicos, fenilpropanoides y flavonoides) debido a su capacidad para quelar metales y de esta manera evitar reacciones Fenton o Haber-Weiss además de su

capacidad de interactuar directamente con los radicales libres para su neutralización o estabilización [19].

Para darnos otra idea de la importancia del metabolismo secundario en las plantas, las vacuolas de almacenamiento ocupan entre un 40 a 90% del volumen interno de las células y juegan un papel importante en la acumulación de metabolitos secundarios. Para el transporte de metabolitos secundarios hacia vacuolas existen dos mecanismos principales: a) transporte secundario dependiente del gradiente de  $H^+$  vía  $H^+$  antiporte y b) mediante transportadores ABC (ATP-binding cassette)[20]. Los transportadores ABC están conformados por una gran familia de proteínas presentes en organismos que van desde bacterias hasta humanos. Se ha demostrado que los transportadores ABC no solo están relacionados con la detoxificación de los organismos (metabolitos secundarios endógenos) sino también participan en procesos biológicos específicos tales como señalización celular[21].

Bajo este contexto es importante establecer estrategias y metodologías para llevar a cabo análisis metabolómicos de tal manera que los resultados obtenidos nos aporten evidencias acerca de los mecanismos moleculares que se activan en las condiciones de estrés. Para cumplir este objetivo, es necesario esbozar un modelo que nos lo facilite, este modelo debe tomar en cuenta los siguientes puntos: (i) tipo de planta a utilizar, (ii) condiciones a las cuales se desarrollará (estrés), (iii) cosecha, (iv) extracción y preparación de la muestra (v) análisis instrumental (vi) análisis de datos y análisis estadístico. Uno de los principales problemas, independientemente del tipo de planta, es el relacionado con el cultivo; específicamente, resulta difícil mantener las condiciones uniformes durante el crecimiento sobre todo si el medio donde crece la planta es suelo, ya que se debe mantener un porcentaje de agua constante o similar en todas las plantas al igual que otras condiciones dentro de la cámara de crecimiento como lo son la luz y la temperatura. Una opción para evitar el suelo es utilizar hidroponia.

La cosecha es uno de los pasos más importantes y debe ser realizada en el momento adecuado. Para mantener la uniformidad y representatividad de la muestra de acuerdo con los objetivos de un análisis metabolómico, las etapas de crecimiento y la selección del tiempo exacto de cosecha y de la parte morfológica, son esenciales. La preparación de la muestra, después del muestreo, puede comenzar deteniendo el metabolismo con nitrógeno líquido.

Otras técnicas son por medio de congelación o tratamiento ácido aunque puede resultar en la pérdida de muchos metabolitos[22]. La liofilización también puede ser utilizada. Sin embargo, mantener el tejido vegetal congelado con su composición original de agua puede traer ciertas ventajas, ya que muestras liofilizadas pueden llevar a la adsorción irreversible de analitos en la pared y membrana celular. Por otro lado, el hecho de utilizar muestras solamente congeladas puede llevar a una baja reproducibilidad en la extracción debido a la variación en la cantidad de agua en las muestras y degradación de moléculas. Ahora, el descongelamiento de la muestra se debe evitar siempre y cuando las proteínas no estén totalmente precipitadas. A temperatura ambiente algunas enzimas tales como hidrolasas y fosfatasas tienden a permanecer activas incluso en soluciones de metanol[22].

### 1.3.3 La metabolómica en los microorganismos.

La metabolómica de microorganismos ha sido uno de los temas más estudiados debido a su relativa menor complejidad, fácil y rápido crecimiento, comparados con otros organismos como lo son las plantas o animales. Además de esto se ha demostrado que los microorganismos tienen un gran potencial como fuentes de productos naturales bioactivos con especial interés en el descubrimiento de fármacos, esto basado en la capacidad de muchos microorganismos de sintetizar una cantidad muy diversa de moléculas dentro de las que cabe señalar el grupo de metabolitos secundarios[23].

En microorganismos prototróficos, el metaboloma consiste en aproximadamente 700 compuestos involucrados en el metabolismo central. En particular, en una bacteria “simple” como *Mycoplasma pneumoniae* se ha estimado un número de 241 metabolitos y para *Escherichia coli* 749; hay que recordar sin embargo que, si incluimos el metabolismo de lípidos y metabolitos secundarios el número de compuestos aumenta substancialmente[24]. Desde que se conocieron las secuencias genómicas de ciertas bacterias y hongos, se ha hecho posible la manipulación de estas secuencias para la inducción de la síntesis de metabolitos secundarios, mediante activación de ciertos genes naturalmente inactivos o mediante la alteración del genoma para crear una variedad de moléculas artificiales vía mutasíntesis.

Una de las ventajas de los microorganismos es su capacidad de crecer en una diversidad de cultivos, sean sólidos o líquidos, o con diferentes componentes nutrimentales bajo distintas

concentraciones lo que lo hace atractivo para la evaluación de ciertos componentes inductores de estrés. También en ellos es relativamente sencillo llevar a cabo análisis de “Fluxomics”, donde se puede rastrear las rutas metabólicas que sigue determinado sustrato marcado con isotopos estables como  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ , etc.[25]. Desde el punto de vista analítico resulta de gran utilidad normalizar los resultados obtenidos por medio de estándares internos pesados, con especial interés en cromatografía acoplada a espectrometría de masas ya que se cuenta con la ventaja de que los compuestos pesados coeluyen con los analitos de interés corrigiendo de esta manera la supresión de señales en la ionización en espectrometría de masas. Si combinamos estas ventajas se puede obtener estándares marcados utilizando cultivos con sustratos pesados como grupo control y contrastarlos contra el cultivo del grupo problema bajo un enfoque “untargeted”[26, 27].

Por otro lado, los microorganismos se encuentran muy diluidos en el medio de crecimiento, lo que dificulta la cuantificación de metabolitos que, por lo general se encuentran en muy bajas concentraciones. A esto le debemos sumar el reto de separar efectivamente los metabolitos intracelulares de los extracelulares. Otro problema que se presenta en este sistema es que hay estudios que demuestran la rapidez con la que cambian los metabolitos dentro de la célula; el metabolismo celular, particularmente el metabolismo central, se ajustan rápidamente a cambios mínimos en el ambiente generando cambios marcados en los perfiles metabólicos en cuestión de segundos [28]. Una manera de detener este proceso es mediante un cambio rápido en la temperatura o el pH para detener el metabolismo, sin embargo, esto puede ocasionar fuga de metabolitos de la célula que varía dependiendo de la estructura de la pared celular y/o de la membrana; por ejemplo al usar una solución al 60% de metanol se ha observado en hongos una fuga de ácidos carboxílicos, aminoácidos, fosfoenolpiruvato, ATP y  $\text{NDA}^+$ [29]. En estos casos se recomienda que la biomasa esté en contacto el menor tiempo posible con la solución utilizada para detener el metabolismo, utilizando para ello comúnmente una filtración o centrifugación rápida.

Una vez que se han separado las células del medio, el siguiente paso es la extracción de los metabolitos mediante diversos protocolos incluyendo extracción con etanol caliente, etanol frío ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ), ácido perclórico, hidróxido de potasio (0.1N), o metanol cloroformo[29],

siendo este último uno de los más efectivos[30]. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta el enfoque del estudio y los objetivos para seleccionar el protocolo de extracción a utilizar.

#### 1.3.4 Metabolómica en biofluidos

La metabolómica permite una evaluación paralela de los niveles de un amplio rango de metabolitos endógenos y exógenos, además ha tenido un gran impacto en la investigación dentro de áreas de fisiología, diagnóstico de enfermedades, descubrimiento de biomarcadores y el impacto sobre las rutas metabólicas que tienen ciertas enfermedades, así como los tratamientos. Las pequeñas moléculas tienen un papel importante en los sistemas biológicos y representan candidatos atractivos para entender el fenotipo que se presenta en ciertas enfermedades. Tal como ya fue mencionado, estas moléculas pequeñas representan un diverso grupo de estructuras incluyendo lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, vitaminas, tioles y carbohidratos y suelen ser analizadas en biofluidos como plasma, sangre, suero, orina, saliva, fluido cerebro espinal, líquido sinovial, semen y tejidos homogeneizados.

##### 1.3.4.1 Orina

La orina es uno de los biofluidos más utilizados en metabolómica, debido a su fácil accesibilidad, matriz química relativamente simple, bajo contenido de proteínas y pocas interacciones moleculares. La orina también es un biofluido con grandes ventajas en lo que se refiere a la preparación de la muestra, además es una fuente rica en biomarcadores y el perfil metabólico en esta muestra puede llegar a ser una herramienta poderosa para evaluar la eficacia terapéutica[31, 32]. Como ejemplo de este tipo de esquemas, en un estudio piloto se realizó el perfil metabolómico en orina utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, para la búsqueda de biomarcadores que pudieran brindar información sobre los patomecanismos del cáncer de próstata encontrándose niveles alterados en las rutas de aminoácidos, metabolismo de purina y glucosa así como urea y el ciclo de ácidos tricarbóxicos[33].

La metabolómica también ha sido una herramienta importante en la identificación de biomarcadores para la predicción y monitoreo necesarios para el diagnóstico de la diabetes, en el que la orina, al ser una muestra que no se obtiene de manera invasiva sumado a otras ventajas ya expuestas anteriormente, tiene gran importancia. Como ejemplo, la determinación de una serie de parámetros clínicos en orina de dos grupos de ratas, junto con el análisis quimiométrico por el método de componentes principales, indicaron niveles elevados de creatina/creatinina, dimetilamina y acetoacetato, con concomitantes niveles decrecientes de citrato, 2-ketoglutarato, lactato, hipurato y succinato en ratas diabéticas respecto a las controles [34]. El estudio metabolómico en la orina provee un perfil de marcadores metabólicos endógenos que correlacionan a un número de factores como género, dieta, enfermedades, toxicidad, tratamientos médicos y edad.

A pesar de todas las bondades que representa este tipo de muestra, uno de los principales problemas es la variabilidad en la concentración de los metabolitos lo cual es ocasionados por el estado de hidratación, así como por las condiciones fisiológicas en las que se encuentra el organismo. Con el objetivo de corregir este problema se han desarrollado diferentes estrategias de normalización, estas pueden ser aplicadas antes de realizar la adquisición de datos o después. Entre las estrategias más usadas están: i) normalizar por la concentración de un compuesto de referencia (creatinina), ii) medir el total de la concentración de solutos (osmolaridad), iii) corregir por la gravedad específica o iv) normalizar utilizando la integración de todas las señales[35].

#### *1.3.4.2 Sangre*

La sangre es uno de los materiales biológicos más utilizados para estudios metabolómicos. El suero sanguíneo y el plasma, como un primer acarreador de metabolitos a través de todo el organismo, pueden proveer mucha información acerca de condiciones fisiológicas y patofisiológicas de un organismo a un tiempo dado. A pesar de tener un papel irremplazable en el descubrimiento de biomarcadores, una de las principales desventajas es la complejidad de la composición química y principalmente son tres factores los que contribuyen a ello; el primero de ellos es la cantidad de proteínas potencialmente interferentes, el segundo es la

vasta diversidad de metabolitos presentes y finalmente el tercero es el amplio rango de concentraciones en el que se pueden presentar los metabolitos de interés. Para remover los componentes de la matriz, se han utilizado diversos procedimientos, los cuales incluyen la precipitación de proteínas con un solvente orgánico miscible en agua (metanol o acetonitrilo) seguida por centrifugación y recolección del sobrenadante; extracción en fase sólida; o extracción en la cual analitos polares y no polares son diferencialmente separados usando una combinación de agua con dos solventes orgánicos miscibles entre sí, uno de ellos también es miscible con agua (metanol) y el otro no (cloroformo). Cada uno de estos procedimientos presenta ventajas y limitaciones; por ejemplo, la precipitación es rápida, barata y segura, pero a menudo los componentes de las muestras contienen grandes cantidades de fosfolípidos, péptidos y pequeñas proteínas lo que hace la separación poco eficiente. La extracción en fase sólida por otra parte genera muestras enriquecidas en cierta clase de metabolitos pero es inadecuada cuando el objetivo es generar un perfil metabolómico con el mayor posible número de compuestos naturalmente presentes en la muestra[36].

En algunos casos, para el diagnóstico y pronóstico de alguna enfermedad, se requiere el análisis de metabolitos en fluidos específicos. Tal es el caso la leucemia linfoblástica aguda, donde se utiliza medula ósea, siendo la toma de muestra de carácter muy invasivo para el paciente. Buscando alternativas viables, se llevó a cabo un estudio metabolómico en suero utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y varios métodos de análisis multivariable obteniendo como resultados la identificación de 30 metabolitos que fueron diferencialmente expresados entre pacientes con leucemia linfoblástica aguda y sujetos control; estos datos sugieren que el metabolismo de glicerofosfolípidos puede ser un mecanismo clave en el progreso de esta enfermedad[37]. Incluso, el análisis metabolómico en sangre también puede ser de utilidad para el diagnóstico de enfermedades de las cuales se desconoce su patogénesis y un mal diagnóstico puede empeorar la situación de quien la padece como lo es el desorden bipolar en el que se han visto diferencias en los niveles séricos de piruvato, ácido N-acetilglutámico, alanina, serina, cetoglutarato y arginina entre pacientes controles y aquellos que padecen esta enfermedad[38].

### *1.3.4.3 Saliva*

La saliva es el biofluido más abundante en la cavidad oral, representa una matriz relativamente sencilla con una composición mayor al 99% de agua y otros compuestos como son enzimas digestivas, factores de crecimiento, citoquinas, inmunoglobulinas, péptidos antibacteriales, células bacterianas, sales y metabolitos de los cuales se han podido identificar hasta 853 compuestos[39]. La saliva es producida por tres pares de glándulas salivales (sublingual, submandibular y parótida) y juega un papel crucial en numerosas funciones fisiológicas, siendo una de las principales la protección antibacterial y antiviral. Muchos compuestos presentes en la saliva también se encuentran en la sangre, esto debido a que se transportan desde la sangre por medio de difusión intracelular pasiva, transporte activo o bien por ultrafiltración extracelular. Así, análogamente a la sangre, la composición química de la saliva puede reflejar el estatus de salud. Además, el análisis de la saliva tiene como ventaja que la toma de muestra es no invasiva, rápida y de bajo costo. Se han desarrollado metodologías con potencial en las áreas de toxicología, fisiología, farmacocinética y estudios forenses. La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fue aplicada para la detección de compuestos orgánicos volátiles en saliva humana en la que se identificaron compuestos como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, amidas lactonas e hidrocarburos[40].

### *1.4 Análisis Instrumental.*

La instrumentación analítica es el medio por el cual obtenemos los datos para después ser analizados e interpretados por métodos estadísticos. Entre las plataformas más utilizadas en metabolómica se encuentran la espectrometría de masas (MS) acoplada o no a técnicas de separación y la resonancia magnética nuclear (NMR).

En esta sección del capítulo se abordarán los aspectos relacionados con estas la plataforma de MS, comenzando con fuentes de ionización, los espectrómetros de masas y por último con las técnicas de separación.

#### 1.4.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite detectar, confirmar/identificar y cuantificar uno o varios analitos en una sola corrida y por lo tanto es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en metabolómica. Hay que resaltar la capacidad de MS para la elucidación de la estructura molecular. El principio de la espectrometría de masas se basa en la conversión de los compuestos presentes en la muestra en iones moleculares y/o sus fragmentos en fase gaseosa seguida por su separación en función de la relación de su masa y carga ( $m/z$ ). Es importante mencionar que la espectrometría de masas no determina directamente la masa; sino el valor  $m/z$  y que un requerimiento fundamental de esta técnica es que los iones deben estar en fase gaseosa antes de su introducción a un separador másico.

Los iones son especies con carga eléctrica y como tales, su trayectoria en el espacio puede ser manipulada con el uso de campos electromagnéticos. Cuando en un espacio físico se encuentran solamente iones individuales a baja presión, estos pueden ser agrupados de acuerdo con sus propiedades (masa y el número de cargas). Con el objetivo de tener iones individuales libres y no otras formas de materia es necesario introducirlos en el vacío, eliminando especies neutrales, radicales, electrones y también fotones. Es por ello que, dentro del espectrómetro es necesario mantener alto vacío, esto es necesario ya que si un ion choca con una molécula neutra y el choque es elástico, este puede desviar la trayectoria del ion y podría no llegar al detector; en cambio, si el choque es inelástico, puede transferirse suficiente energía para descomponerlo, lo que significa que el ion original no será detectado.

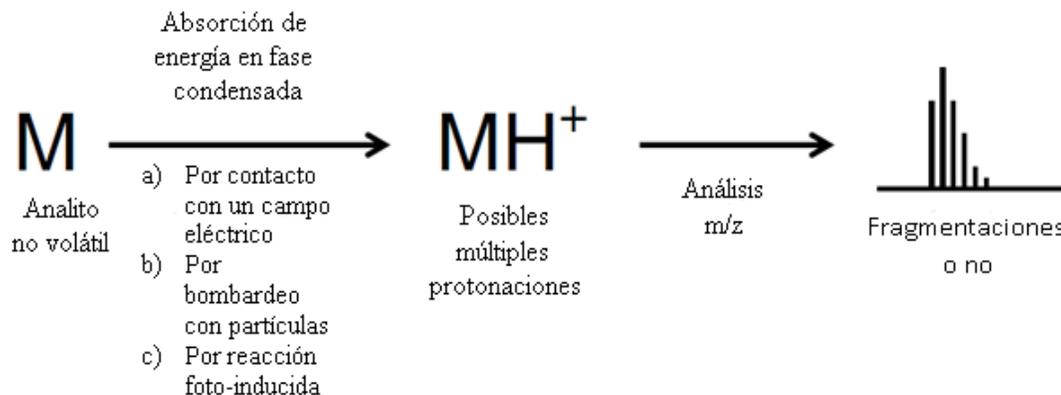


Figura 1. Ilustración del análisis de analitos en fase condensada mediante ionización suave y espectrometría de masas.

A continuación, haremos una breve descripción de las variantes más importantes de cada uno de los elementos de un espectrómetro de masas.

#### 1.4.2 Fuentes de ionización.

##### 1.4.2.1 *Electro ionización.*

En esta fuente de ionización, la ionización ocurre en la fase gaseosa y el elemento principal es un filamento de metal que es calentado eléctricamente a incandescencia o a la temperatura a la cual emite electrones. Los electrones emitidos (70 eV) son atraídos por un ánodo situado en el lado opuesto de la cámara de ionización del filamento o cátodo. Los electrones son forzados por un campo eléctrico a través del centro de la cámara como un haz colimado por una abertura cerca del filamento.

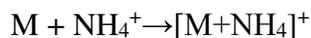
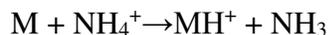
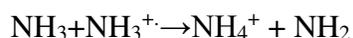
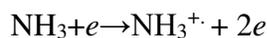
En el proceso de ionización una molécula absorbe energía durante la interacción del electrón ionizante con su nube de electrones, esto da como resultado especies secundarias que pueden reaccionar subsecuentemente con el medio, entre ellas, electrones secundarios con suficiente energía cinética para inducir ionización por impacto de electrones e ionización por impacto de electrones disociativa[41].

A partir de un compuesto, en EI se produce su ion molecular y los iones de fragmentación, es la técnica de ionización comúnmente utilizada en cromatografía de gases y las bibliotecas comerciales se obtuvieron con base en ella.

#### 1.4.2.2 Ionización química (CI).

La ionización química (CI) fue introducida como la primera de las técnicas de ionización suave; en ella se produce un ion representativo del analito sin fragmentaciones importantes. Así, el espectro de un compuesto obtenido mediante CI consiste principalmente de la señal de su ion molecular. Por definición la CI involucra una reacción ion/molécula, en la cual el analito en forma de molécula en fase gaseosa colisiona con un ion en fase gaseosa. El resultado es la formación de aductos (usualmente, el más abundante es la molécula del analito protonada). La fuente de ionización en CI es similar a la de EI, excepto que la cámara es más pequeña, lo que ocasiona que la presión sea más alta. Como en la fuente convencional de EI, la fuente de electrones en CI es un filamento caliente. Los electrones emitidos son acelerados dentro de la cámara de ionización con energías altas (arriba de 100 eV).

Hay una variedad de gases que son utilizados, pero los más comunes son metano, isobutano y amonio. Una abreviación de los mecanismos se muestra en las siguientes ecuaciones:



Cuando la afinidad por el protón de M es menor que la del amonio (202 kcal/mol) pero más grande que 188 kcal/mol, el aducto con el ion amonio es observado con una buena sensibilidad. Cuando la afinidad por el protón de M es más grande que la afinidad por el protón de amonio ambos aductos pueden ser observados[42].

#### 1.4.2.3 Ionización química a presión atmosférica (APCI).

La ionización en este caso es llevada a cabo en una cámara a presión atmosférica en comparación con la presión de 100 Pa para CI o 1000 Pa para EI. En la ionización química a presión atmosférica (APCI), la ionización es iniciada por electrones de baja energía de una fuente radiactiva beta o corona de descarga. Los electrones de baja energía ionizan un gas ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , etc.), que a través de una serie compleja de reacciones ion/molécula producen iones positivos y negativos del analito.

Durante la operación, la fuente APCI es purgada con N<sub>2</sub> o algún otro gas. La alta eficiencia de ionización ocurre a presión de 760 torr, la cual se traduce en un incremento del número de colisiones entre las moléculas de la muestra y los iones del reactivo.

#### *1.4.2.4 Ionización por electro nebulización (ESI).*

La ionización por electro electro nebulización se lleva a cabo a la presión atmosférica y, desde su introducción a la espectrometría de masas ha emergido como una importante técnica para el análisis de una amplia gama de compuestos desde biopolímeros con alta masa molecular hasta iones metálicos. Empíricamente se ha encontrado que los mejores resultados analíticos son obtenidos en compuestos que son iónicos en solución como, por ejemplo, sales metálicas, sales orgánicas y compuestos como péptidos y proteínas que pueden ser ionizados con la ayuda de ácidos/bases de Lewis y Bronsted. Las especies son típicamente observadas como protonadas, sodiadas u otro tipo de moléculas cationizadas en modo ion-positivo y como moléculas desprotonadas o como aductos aniónicos en modo ion-negativo[43].

Son tres los pasos importantes en la producción de iones en fase gaseosa a partir de una solución: a) La producción de gotas cargadas en la punta del capilar, b) encogimiento de las gotas durante la evaporación del solvente y repetidas desintegraciones de las gotas inducidas por las repulsiones entre las mismas cargas obteniendo como resultado gotas más pequeñas también altamente cargadas, capaces de producir iones en fase gaseosa, c) el mecanismo por el cual los iones en fase gaseosa se forman a partir de esas gotas.

El voltaje aplicado al capilar de electro nebulizador es del orden de 2-3 kV. Típicamente, el capilar está ubicado a 3 cm del contraelectrodo, que en este tipo de equipos puede ser un plato con un orificio que lleva al sistema de muestreo del espectrómetro, o un capilar de muestreo montado sobre el plato el cual lleva al espectrómetro de masas. La muestra es introducida en el capilar en forma diluida y utilizando solvente polar (suele ser metanol, metanol-agua, acetonitrilo, acetonitrilo-agua).

Cuando la solución es introducida por el capilar, el campo eléctrico es más fuerte cerca de la punta del capilar lo que favorece la polarización del solvente cerca del menisco del líquido. Incluso en la presencia de trazas de un electrolito, la solución tendrá la suficiente conductividad y los iones del electrolito positivo y negativo en la solución se moverán bajo la influencia del campo. Esto lleva a un aumento de la cantidad de iones positivos cerca de

la superficie del menisco y los iones negativos lejos del menisco. La fuerza del campo causa una distorsión del menisco transformándolo en un cono. El incremento de la superficie durante la formación del cono está resistido por la tensión superficial del líquido. El cono formado es llamado cono de Taylor. Si el campo aplicado es suficientemente fuerte, la punta se vuelve inestable y un fino chorro emerge de la punta del cono. La superficie de las gotas del aerosol está cargada por un exceso de iones positivos lo que provoca que este se rompa en pequeñas gotas cargadas. Las gotas cargadas derivan campo abajo a través del espacio al electrodo opuesto. La evaporación del solvente de las gotas debido al flujo del gas de secado lleva al incremento del campo eléctrico en la superficie de las gotas, teniendo como consecuencia el incremento de la repulsión entre las cargas contenidas en la gota dando como resultado lo que se llama explosión coulombica y finalmente aparecen iones positivos en fase gaseosa[44].

#### *1.4.2.5 Desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).*

En MALDI, la ionización de las moléculas del analito ocurre desde la fase sólida y es asistida por un compuesto, la matriz, que absorbe energía láser promoviendo la ionización de las moléculas de interés. Gracias al uso de la matriz, es posible obtener la ionización de compuestos polares y en un intervalo muy grande de masa molecular (hasta cientos kDa). La muestra junto con la matriz son co-cristalizadas dentro de un objetivo sólido, usualmente un plato de metal. Usando un pulso láser dirigido sobre la muestra/matriz, activan la matriz y las moléculas del analito son vaporizadas, la desorción de moléculas de la fase sólida y la transición a la fase gaseosa es seguida por la ionización, usualmente como la transferencia de protones entre las moléculas de la matriz y el analito[45]. Uno de los papeles de la matriz es la de separar el analito (por dilución) para evitar las interacciones entre las moléculas de los analitos durante el proceso de ionización, sin embargo, el papel clave de la matriz es el de absorber la radiación láser protegiendo de esta manera al analito y ayudando en su ionización. Entre las características que deberá tener la matriz es que sea capaz de integrar y aislar las moléculas del analito, ser soluble en los solventes compatibles con el analito, ser estable en el vacío, absorber la energía láser y promover la ionización del analito[45].

La matriz y la muestra se mezclan en un solvente orgánico o acuoso. Una vez que el solvente es removido, las moléculas de la matriz y el analito se co-depositan en el plato. La incorporación homogénea del analito en la matriz cristalina es crítica para el proceso.

En cuanto al proceso de ionización, se ha propuesto que la fotoionización de las moléculas de la matriz es considerada el primer mecanismo para la subsecuente ionización del analito en fase gaseosa. La absorción de varios fotones es el principal proceso para que se lleve a cabo la ionización de la matriz, para después, por medio de colisiones entre este ion y el analito producirse la protonación y desprotonación[46].

#### 1.4.3 Guía de iones.

La pérdida de iones durante su paso por los componentes de un espectrómetro de masas es inevitable, con los sitios críticos que se encuentran entre la fuente de ionización y el analizador másico, y entre el analizador másico y el detector. Así, se han diseñado varios dispositivos con el fin de aumentar la eficacia de transmisión de iones, entre los que se encuentran aquellos que lo hacen por medio de radiofrecuencia, lentes y túneles de iones.

El uso de multipolos de radiofrecuencia como guía de iones producidos a presión atmosférica es una práctica común en espectrometría de masas. Las guías de iones de este tipo son generalmente cuadrupolos, hexapolos u octapolos[47]. En estos casos, hablamos de un dispositivo de transmisión de iones bidimensional, donde iones de baja energía cinética son confinados en campos de radiofrecuencia y en algunos casos con campos de corriente directa. Para propósitos ilustrativos, se tomará como ejemplo un octapolo lineal. La guía es construida con 8 electrodos en forma de rodillos acomodados en un arreglo circular, se alternan los rodillos que son conectados juntos para formar dos grupos de 4. Los dos grupos de electrodos son conectados a fases opuestas de una corriente de rf, así que voltajes de rf de igual magnitud, pero aplicando signos opuestos; en adición a la rf, pueden ser utilizados potenciales de corriente directa. En casi todos diseños, los voltajes de rf son superpuestos sobre un potencial dc aplicado en ambos grupos de rodillos. Este potencial dc simplemente establece el potencial central de la guía, lo que permite que la energía cinética del ion en la guía sea ajustada. Esto significa que los iones serán enfocados en el eje central del instrumento moviéndose hacia la salida [48].

Otro dispositivo es el túnel de iones, el cual consiste en una serie de electrodos en forma de anillo con diámetros progresivamente más pequeños que tienen potenciales rf y de simultáneamente aplicados, la combinación de colisiones de iones con átomos neutrales de gas y la combinación de estos campos, causan que los iones sean enfocados en un haz.

Los lentes pueden ser usados para enfocar un haz de iones sin alterar su energía cinética total; estos lentes son empleados en sistemas que no proveen un enfriamiento por colisiones de un gas neutro tales como MALDI-TOF y GC-MS.

#### 1.4.4 Separadores máscicos

El separador de masas es la parte esencial de un espectrómetro de masas, cuyo papel es lograr la separación de iones que entran en la zona de un vacío, en función de la relación entre su masa y carga ( $m/z$ ). Los separadores de masa funcionan como un filtro (cuadrupolo, trampa iónica) o como un analizador de masas (tiempo de vuelo, sector del campo electrostático y/o magnético). A continuación, se dará una breve descripción de los analizadores máscicos más utilizados actualmente.

##### 1.4.4.1 Tiempo de vuelo (TOF)

El principio del funcionamiento del analizador máscico tiempo de vuelo (TOF) es que una población de iones de diferentes  $m/z$  se mueve en la misma dirección teniendo más o menos una energía cinética constante. Tendremos una distribución correspondiente de velocidades en la cual la velocidad es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la  $m/z$ , por lo que su tiempo de llegada al otro extremo del tubo donde se encuentra el detector será distribuido de acuerdo a la raíz cuadrada de su  $m/z$ . Con el fin de que los iones tengan la misma energía cinética al entrar al tubo de vuelo libre, son acelerados mediante un pulso de potencial eléctrico. El tubo tiene una longitud de 1 o 2 metros que es la distancia que recorren los iones hasta el detector[49].

El poder de resolución del TOF depende de varios factores; en un instrumento lineal está en función de la longitud del tubo de vuelo, del voltaje de aceleración y lo más importante, de la distribución espacial y de velocidades en el paquete inicial de iones. En teoría, este paquete de iones debería ser infinitesimalmente delgada y monoenergética; pero en la práctica, debido a la variación de direcciones de viaje, velocidades de pre-aceleración y variaciones en energías térmicas, el paquete tiene un valor discreto de delgadez y limitará la resolución[50].

Con el propósito de mejorar la resolución del TOF, se puede utilizar un espejo iónico cuyo objetivo es invertir la dirección de su vuelo, logrando que los iones con la misma  $m/z$  pero diferentes energías cinéticas sean enfocados mejor respecto al modo linear. Este espejo consta de un campo eléctrico que es opuesto y de una magnitud mayor que el campo eléctrico en la zona de aceleración de iones; el espejo es posicionado en un ángulo menor a  $180^\circ$ . El principio de operación puede ser ejemplificado al imaginar 3 iones con la misma  $m/z$  pero con diferentes energías cinéticas, todos iones entran al campo eléctrico opuesto, sin embargo, aquellos que tienen mayor energía cinética entran primero pero también entran más profundo en el campo eléctrico. Los iones siguen desacelerándose en el campo eléctrico opuesto hasta que su energía cinética llega a cero. En este punto los iones empiezan a ser acelerados en dirección opuesta, los iones con más alta energía cinética inicial tenderán a penetrar más en el espejo adquiriendo una mayor energía cinética durante su re-aceleración, que los iones con más baja energía cinética inicial. Al final, los iones dejarán el espejo con la misma distribución de energía cinética y velocidad que inicialmente tenían, sin embargo, sus distancias de viaje ahora difieren debido a la penetración en el campo opuesto llegando al mismo tiempo al detector. Otra variante puede ser la aceleración ortogonal, la cual toma una muestra del grupo de iones y los desvía ortogonalmente para ser reflejados y posteriormente detectados lo que aumenta la resolución másica.

#### *1.4.4.2 Trampa de iones.*

La trampa iónica es un artefacto que actúa como un filtro de masas, mediante almacenamiento de iones con ciertos valores  $m/z$  por un periodo de tiempo, seguida por su expulsión hacia el detector. El pozo de potencial de captura creado con la trampa iónica puede ser ejemplificado como un tazón con secciones transversales parabólicas; las especies iónicas son confinadas en el tazón en diferentes capas horizontales. Al inclinar el tazón a la derecha, es vertida la capa que corresponde a los iones de  $m/z$  más baja. La inclinación del tazón corresponde a la rampa de radiofrecuencia.

El dispositivo de trampa iónica consiste esencialmente de tres electrodos, dos de estos electrodos son idénticos y tienen geometría hiperboloide, estos son llamados electrodos “end-cap” y se distinguen por el número de hoyos en el centro de cada electrodo, en la mayoría de los equipos estos electrodos tienen una sola perforación donde por un lado los iones pueden

pasar periódicamente y por el otro electrodo pueden salir al detector. El tercer electrodo también tiene una geometría hiperboloide y es llamado electrodo anillo. Este electrodo es posicionado simétricamente entre otros dos electrodos. La geometría de los electrodos está definida para generar un campo cuadrupolo ideal el cual producirá un pozo de potencial para el confinamiento de los iones[51].

Dentro de la trampa iónica, se puede realizar la fragmentación de iones almacenados, lo que permite obtener los espectros de masas  $MS^n$ , para la identificación de compuestos y su cuantificación mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM)

#### *1.4.4.3 Cuadrupolo.*

El cuadrupolo es un filtro de iones, en el que se cambian continuamente las condiciones del campo electromagnético de tal manera que cada ajuste permite pasar por el filtro los iones de un específico valor  $m/z$ , mientras que todos los otros son desviados y neutralizados dentro del dispositivo. Físicamente, el cuadrupolo consiste en un grupo de 4 electrodos, idealmente con una sección transversal hiperbólica, que esta exactamente posicionada en un arreglo radial. Por razones prácticas, la mayoría de los cuadrupolos emplean electrodos con secciones transversales circulares.

La acción del cuadrupolo como filtro de masas es obtenida mediante la aplicación de una combinación de potenciales de corriente continua (dc) y corriente alterna (ac) a dos pares de barras. El par de los electrodos en el plano vertical se conecta al polo negativo de una fuente variable de corriente continua y el otro par al terminal positivo; además, cada uno de los pares de electrodos (barras) se conectan a la fuente de corriente alterna de radiofrecuencia que están desfasados por 180 grados entre sí. La operación de un cuadrupolo es mejor visualizada al considerar el efecto que tienen la estructura del electrodo y el potencial aplicado sobre la trayectoria de una partícula cargada en los planos X-Z (polarización positiva) y Y-Z (polarización negativa), separadamente. Empezaremos por considerar el efecto que tiene el potencial ac en la trayectoria de un haz de electrones viajando en X-Z (Figura 2).

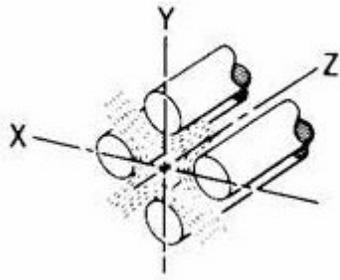


Figura 2. Orientación de los planos en un arreglo de cuadrupolo.

Durante un único periodo de la aplicación de ac, en la ausencia de un potencial dc, los electrodos permanecen a lo largo del eje X  $\frac{1}{2}$  ciclo a un potencial positivo y  $\frac{1}{2}$  ciclo a un potencial negativo, relativo al centro de los ejes del instrumento. Cuando el potencial ac es positivo con respecto al centro de los ejes, un haz de iones positivos puede ser acelerados o enfocados hacia el centro de los ejes de la estructura del cuadrupolo. Ahora, cuando el potencial aplicado es negativo, el haz de iones positivos será acelerado hacia los electrodos parcialmente negativos, así los iones positivos son desenfocados del centro de los ejes.

Ahora veamos la aplicación de un potencial positivo dc a los electrodos que se mantienen en el plano X-Z. Si un ion es muy pesado o/y la frecuencia de ac es muy rápida, un ion tenderá solo a sentir el efecto de la media del potencial aplicado a la estructura del electrodo, así los iones pesados tenderán a ser afectados por el potencial positivo del dc; lo que significa que los iones serán enfocados dentro del centro de los ejes del instrumento. Los pequeños periodos de tiempo donde los electrodos están a un potencial negativo tendrán un efecto despreciable en la trayectoria de los iones pesados. En contraste, si los iones son suficientemente ligeros, su ruta será considerablemente afectada por las variaciones de polaridad de ac, en este caso los iones chocarán con los electrodos y para ser neutralizados y bombeados fuera del quadrupolo. Como resultado, el par barras horizontales funciona como filtro permitiendo el paso de iones pesados.

Enseguida consideraremos la naturaleza de la trayectoria de los iones en el plano Y-Z (polarización dc negativa). El potencial aplicado a los electrodos que se mantienen a lo largo del eje de las Y es igual en magnitud, pero opuesto en sentido al potencial aplicado al eje de

las X. Esto significa que ac aplicada a los electrodos del eje de las X es de  $180^\circ$  fuera de fase con el potencial aplicado a los electrodos en el eje Y. Pero aún más importante es el hecho de que el potencial dc aplicado a los electrodos que se mantienen en el plano X-Z es positivo, mientras el potencial dc aplicado a los electrodos en el plano Y-Z es negativo. Los iones pesados, teniendo una mayor inercia que los ligeros, tenderán solo a ser afectados por el potencial dc. En este caso el potencial dc es negativo, esto significa que los iones positivos pesados tenderán a ser eliminados, por otra parte, si el ion es suficientemente ligero, este puede responder a la acción de enfocamiento que resulta cuando la porción positiva del campo alternante llega a ser más grande que el potencial estático negativo. Es por ello que el par de electrodos en la planada vertical funciona como filtro de los iones ligeros. En resumen, un ion que viaje en los planos X-Z y Y-Z de la fuente al detector, debe ser estable en ambos planos para que puede llegar a su objetivo, lo que significa que el ion debe ser suficientemente ligero que no sea eliminado por el filtro del plano Y-Z pero no tan ligero que sea eliminado por el filtro X-Z[52]. El barrido de espectro se obtiene mediante un cambio continuo de los ajustes de dos tipos de campos, dc y ac manteniendo la relación entre ellos constante.

#### 1.4.5 Acoplamientos de MS con técnicas de separación.

El acoplamiento de técnicas de separación con la espectrometría de masas es la plataforma más usada hoy en día para los estudios metabolómicos, aunque también se han utilizado las técnicas de separación off-line. La sinergia que ofrece el acoplamiento es ideal para la obtención de una gran cantidad de datos referente al sistema además de que facilita el tratamiento de estos.

El uso de espectrometría de masas en modo de infusión directa ha sido propuesto para realizar escaneos y puede ser útil en la identificación de compuestos en mezclas; en tal caso, se requiere de una alta resolución de masas. A pesar de la excepcionalmente alta selectividad de MS de alta resolución, para muestras de matriz químicamente compleja, la falta de una separación previa tiene efectos indeseables debido a la introducción al sistema de ionización de un número elevado de moléculas desconocidas, con propiedades y concentraciones también desconocidas que pueden afectar la eficacia de ionización del compuesto de interés,

además de la obtención de espectros muy complejos, difíciles de interpretar. En particular, algunos analitos sufrirán de una baja eficacia de ionización y por consecuencia habrá una supresión de iones aunado a la incapacidad para identificar isómeros y compuestos isobáricos. Bajo este margen daremos una breve descripción de los acoplamientos de técnicas de separación con espectrometría de masas[53].

#### *1.4.5.1 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)*

Actualmente, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) representa la plataforma más utilizada en el campo de la metabolómica; también tiene un fuerte papel en otros campos de las “omics” como lo es la proteómica o metaloproteómica. En metabolómica, la prominencia de LC-MS se debe principalmente a la versatilidad de LC, en la que se cuenta con diferentes mecanismos, columnas y fases móviles para separar compuestos no-volátiles en una amplia gama de sus propiedades; además, hay que mencionar la disponibilidad comercial de un amplio número de instrumentos LC-MS, de los programas de computadora especializados en el tratamiento de los datos obtenidos y de bases de datos tanto gratuitas como de pago [54].

El continuo desarrollo en la tecnología de LC y de MS ha llevado a notables avances en su capacidad de separación, detección, identificación y cuantificación de compuestos, así como en el aumento en la velocidad de adquisición de datos, entre otros aspectos. Sobre las características operacionales de los espectrómetros ya hemos hablado anteriormente, ahora ahondaremos un poco en cuanto a la técnica de separación. Hay diferentes tipos de columnas disponibles para metabolómica las cuales permiten una adecuada retención y separación de diferentes especies químicas. La LC en fase inversa es una de las modalidades más utilizadas, la cual tiene las ventajas de tener alta resolución, buena repetibilidad, permite utilizar fases móviles compatibles con fuentes de ionización (ESI, APCI) y cubre un alto rango de metabolitos, especialmente para el análisis de metabolitos no polares y medianamente polares. Columnas con partículas debajo de 2  $\mu\text{m}$  y UHPLC ahora son usadas comúnmente para perfiles metabólicos de muestras clínicas; comparado con el convencional HPLC, el UHPLC provee más alto rendimiento en el análisis de metabolitos. Debido a que la mayoría de los metabolitos polares no pueden ser analizados en fase inversa, una alternativa

relativamente reciente son las columnas en las que la fase estacionaria contiene pentafluorofenilpropil (PFPP); estas columnas combinan las propiedades de fase inversa y de fase normal. Además de una buena separación, la velocidad juega un papel importante en algunos aspectos de la metabolómica, las columnas con núcleo sólido así como las monolíticas cumplen con este requisito[55].

Con el objetivo de cubrir los metabolitos polares también pueden ser utilizadas las columnas HILIC, estas columnas se pueden emplear junto con las columnas de fase inversa como complemento para el análisis de metabolitos polares.

#### *1.4.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Al igual que LC-MS, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas representa una poderosa sinergia para los estudios metabolómicos, específicamente para los compuestos volátiles, semi-volátiles y termoestables. Entre las ventajas que presenta es que puede separar componentes de una mezcla compleja así que espectros de masas de compuestos individuales pueden ser analizados con propósitos cualitativos y cuantitativos. Las técnicas de ionización en acoplamientos GC-MS están restringidas a aquellas que requieren los analitos en fase gaseosa (EI, APCI, CI, etc.). GC-MS provee idealmente el espectro del compuesto dando evidencia directa de la masa nominal y, en el caso de EI, provee un patrón característico de fragmentación que puede ser usado para la identificación del analito.

La combinación CG-MS lleva a suplir ciertas deficiencias de cada una de las técnicas por separado. Por ejemplo, el estudio de una mezcla compleja por MS da como resultado espectros de masas superpuestos de dos o más compuestos. Por otro lado, el análisis de esta mezcla por CG con un detector menos selectivo puede llevar a resultados cuestionables resultantes de la ambigüedad de utilizar solamente los índices de retención para tratar de identificar los compuestos.

Las aplicaciones de CG-MS en estudios metabolómicos son diversas, entre las que se encuentran análisis en busca de compuestos con actividad antimicrobiana[56] y el análisis de

hasta 110 metabolitos de extractos bacterianos[57], lo que demuestra el alcance de esta plataforma, su reproducibilidad y potencial para análisis tanto en investigación como también, de una manera sobresaliente, para análisis rutinarios. Hay que enfatizar sin embargo que GC puede ser utilizado únicamente para la separación de compuestos volátiles/semi-volátiles o aquellos que pueden ser convertidos en volátiles mediante una reacción de derivatización adecuada.

## 2. Objetivos.

### 2.1. Objetivo general.

El objetivo de este trabajo es el de desarrollar procedimientos basados en espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de distintos metabolitos que están relacionados con el estrés ambiental en muestras biológicas.

### 2.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de estrés abiótico impuesto por el Cr(VI) sobre el perfil de aminoácidos en *B. cereus* utilizando marcaje diferencial in vivo con el isótopo  $^{15}\text{N}$  y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Poner a punto un procedimiento para la determinación de aminas biogénicas por cromatografía de líquidos alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas con trampa de iones por medio de electro nebulización y monitoreo de reacciones múltiples, para su aplicación en el análisis de sistemas biológicos bajo estrés abiótico.
- Realizar un estudio metabolómico “untargeted” evaluando el impacto de Cr(VI) en raíz de girasol.
- Evaluar el efecto de Cr(VI) sobre la ruta del ácido linoleico en raíz de girasol, mediante herramientas de metabolómica.

## 3. Parte experimental.

### 3.1 Equipo de laboratorio

#### 3.1.1 Instrumentación analítica.

1. Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500 cc (Agilent Technologies), con celda de colisiones/reacciones tipo octapolo.

2. Cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, desgasificador, compartimento con termostato para columna y un automuestreador.
3. Espectrómetro de masas trampa iónica Amazon SL equipado con una fuente de ionización por electro nebulización (ESI-ITMS) (Bruker Daltonics).
4. Espectrómetro de masas de alta resolución maXis Impact: ionización ESI y cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).
5. Espectrofotometro UV-Vis Spectronic 3000 con detector de arreglo de diodos (Milton Roy).

### 3.1.2 Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos.

Purificador de agua Mili Q WaterPro PS (Labconco).

pH metro 3200P (Agilent technologies).

Liofilizador FreeZone 2.5 Plus y frasco Fast-Freeze 600 mL (Labconco).

Centrifuga Z 36 HK (Hermle).

Concentrador al vacío Vacufuge Plus (Eppendorf).

Baño seco digital Accu Block (Labnet).

Termómetro IR (SPER Scientific).

### 3.2 Estándares y reactivos.

Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de amonio, glucosa, citrato de sodio, dicromato de potasio, cloruro de cadmio, cloroformo, metanol, metil cloroformiato, n-propanol, dimetil sulfóxido, diclorometano, hexano, dicloruro de putrescina, dicloruro de cadaverina, trihidrocloruro de espermidina (SPD), tetrahidrocloruro de espermina y 1,6-diaminohexano, ácido fórmico, formiato de amonio, acetonitrilo y ácido linoleico.

Agua desionizada 18.2 MΩ cm (Labconco).

### 3.3 Programas de análisis de datos.

Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics)

QuantAnalysis (Bruker Daltonics)

SIRIUS 4.0 (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>)

CSI:FingerID 1.1.2 (<https://www.csi-fingerid.uni-jena.de/>)

ProfileAnalysis Versión 2.1 (Bruker Daltonics)

MS Data Review Versión 8.2

MS-Finder Versión 2.28 ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-FINDER/](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-FINDER/))

MS-Dial Versión 2.82 ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-DIAL/](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/))

Excel Office 365

### 3.4 Material biológico

Semillas de girasol *Helianthus annuus* obtenidas de una tienda especializada en jardinería marca Vita.

Semillas de *Lepidium sativum* cv. *Ogrodowa* obtenidas en una tienda especializada en jardinería marca Vita.

Bacteria *Bacillus cereus*.

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1 Estudio del efecto de estrés abiótico impuesto por el Cr(VI) sobre el perfil de aminoácidos en *B. cereus*.

#### 4.1.1 Introducción.

Desde hace algunos años es bien conocido que los llamados metales pesados tienen efectos nocivos en la salud de humanos y otros mamíferos; no solamente los elementos clasificados como tóxicos, sino también los que son benéficos pueden causar efectos adversos al presentarse fuera del rango de su esencialidad.

Uno de los mecanismos de toxicidad ocasionada por metales pesados más estudiados es mediante el aumento del estrés oxidativo. Este estrés se presenta cuando hay un desbalance entre la producción y neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS, el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radical hidroxilo, son productos naturales de la respiración mitocondrial, por los que los organismos cuentan con varios sistemas de neutralización de estas especies altamente reactivas y nocivas en el ambiente celular. Si estos mecanismos (enzimáticos y no-enzimáticos) pierden su eficacia, las ROS se forman en exceso causando daños oxidativos a la célula, por ejemplo, pueden derivar en lesiones al DNA y posteriormente en mutagénesis.

Además del daño que pueden causar a macromoléculas, hay evidencia de que las ROS también están involucradas en la señalización celular actuando como segundos mensajeros [45]. Algunos ejemplos de estructuras reguladoras redox en la señalización molecular son: los grupos tiol en algunas enzimas (fosfatasa), grupos tiol como sensores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Bajo este marco es importante el desarrollo de procedimientos para llevar a cabo análisis semicuantitativos o cuantitativos del daño causado por este tipo de estrés en sistemas biológicos. Como ya hemos mencionado anteriormente las bacterias presentan ciertas ventajas como sistemas biológicos para estudios metabolómicos, entre los que se encuentra la fácil obtención de la biomasa y la selección oportuna de los nutrientes que se encuentran en el medio para llevar a cabo sus funciones biológicas. Entre los grupos de metabolitos que se pueden encontrar en concentraciones relativamente altas intracelularmente están los aminoácidos (49%), seguido de nucleótidos (15%), intermediarios del metabolismo central (15%) y cofactores redox y glutatión (9%)[58].

Tomando en cuenta las características antes mencionadas, el uso de bacterias para análisis metabolómicos utilizando como estrategia el marcaje diferencial de los cultivos expuestos al estrés versus controles y la medición de la relación isotópica de los metabolitos provenientes de ambos cultivos resulta ideal, ya que es un procedimiento que suma robustez y normalización al método debido a que se corrigen efectos de extracción e ionización cuando se hace por espectrometría de masas[59, 60].

#### 4.1.2 Objetivo particular.

- Desarrollar un procedimiento para llevar a cabo un análisis semicuantitativo de los aminoácidos intracelulares presentes en la bacteria *B. cereus* utilizando marcaje diferencial in vivo con el isótopo  $^{15}\text{N}$  y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### 4.1.3 Condiciones experimentales.

Se inoculó una placa de agar-agar con la bacteria *Bacillus cereus* y se incubó a 37 °C durante 16 horas. Se tomó un inóculo de una colonia de la placa y se introdujo en un tubo de ensayo con 2.5 mL de medio mínimo (Tabla 1), se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 16 horas.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo mínimo.

Medio de cultivo	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	80 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	44 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	43 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	182 mM
Glucosa	46 mM
Citrato de sodio	71 mM

Se tomaron volúmenes de 50  $\mu\text{L}$  y se añadieron a dos tubos con 2.5 mL de medio de cultivo mínimo; en uno de los medios se utilizó cloruro de amonio con abundancia natural de isótopos N (99.63% del isótopo  $^{14}\text{N}$ ;  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y al otro medio se agregó el reactivo con isótopo  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) en las mismas concentraciones indicadas en la Tabla 2. Para minimizar el efecto que el  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  arrastrado del primer tubo pudiera tener en el medio con  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  se hizo una dilución más de cada uno de los dos tubos, pasando 50  $\mu\text{L}$  de cada uno a otros 2.5 mL de medio, dos de  $^{14}\text{N}$  y uno de  $^{15}\text{N}$  respectivamente. Después, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 17 horas.

Una vez pasadas las 17 horas se tomaron alícuotas de 0.990 mL de los tubos de  $^{14}\text{N}$  con la última dilución y se agregó 0, 5 y 10  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  que contenía 1000 mg/L de Cr y cuando fue necesario se agregó agua para completar el volumen a 1 mL. Siguiendo el mismo protocolo, se prepararon los cultivos control, que crecieron en presencia de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  y sin agregar Cr(VI). Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C y 200 rpm.

Después de 6 horas se midió la densidad óptica de las muestras a 600 nm con el objetivo de realizar las diluciones apropiadas y de esta manera asegurar el mismo número de células tanto del cultivo control ( $^{15}\text{N}$ ) como de los cultivos expuestos a Cr(VI) ( $^{14}\text{N}$ ).

Hay que enfatizar que, después de las diluciones, se tomaron tres réplicas para cada uno de los cultivos que crecieron con 0, 2.5, 5 y 10 mg/L de Cr(VI) y todas ellas contenían principalmente  $^{14}\text{N}$ ; asimismo se obtuvo el cultivo control (no expuesto a Cr(VI)) donde las células contenían  $^{15}\text{N}$ . Para la medición de las relaciones isotópicas, se mezcló 0.5 mL de la solución del cultivo control con el volumen correspondiente de cada una de las muestras de cultivos expuestos a Cr(VI), obteniéndose en cada uno de los casos iguales cantidades de bacterias marcadas con  $^{15}\text{N}$  (controles) y sin marcar (expuestas).

A continuación, se procedió a realizar la extracción de los metabolitos, en este caso aminoácidos. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 14000 g y se retiró el sobrenadante. Enseguida se resuspendió la pastilla en 0.5 mL de una mezcla metanol: cloroformo 2:1 y se sonicó por tres ciclos de 180 segundos, entre cada ciclo se agitaba en el vortex durante 5 segundos.

Después, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 300  $\mu\text{L}$  de agua y las muestras se agitaron. De esta manera se obtuvo la separación de dos fases, de las cuales se colectó la fase acuosa. La solución se pasó por una punta sorbente para retención de los aminoácidos y, después de lavado con 200  $\mu\text{L}$  de n-propanol, los compuestos retenidos en la resina se eluyeron con 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla hidróxido de sodio: n-propanol 3:2. Para el análisis GC-MS, fue necesaria la derivatización de aminoácidos para convertirlos en compuestos volátiles. Para ello, a cada muestra se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de metil cloroformato como agente derivatizante. Finalmente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de iso-octano y 200  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 1N. Para la mezcla de estándares de aminoácidos, se llevó a cabo el mismo procedimiento de derivatización de aminoácidos. A final, se toma una alícuota de la fase orgánica que contiene los compuestos derivados para su análisis por GC-MS bajo las condiciones que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones del GC-MS para el análisis de aminoácidos después de su derivatización con metil clorofornato.

GC-MS (modelo Scion TQ, Bruker Daltonics)	
Columna	BR-5ms, longitud 15 m, 0.25 mm ID, 0.25 $\mu$ m de recubrimiento
Gas acarreador	Helio
Flujo en columna	1 mL/min
Inyección	split 1:10
Volumen de inyección	1 $\mu$ L
Temperatura del inyector	250 °C
Programa de temperatura en el horno	Temp. Inicial 110 °C, 2 min 20°C/min hasta 290 °C, 2 min
Rango de detección, <i>m/z</i>	60-300

#### 4.1.4 Resultados y discusión.

Para la identificación de aminoácidos en las muestras se compararon los tiempos de retención con los obtenidos para estándares de los aminoácidos, además de los valores *m/z* de iones característicos del espectro de fragmentación de los aminoácidos con los estándares.

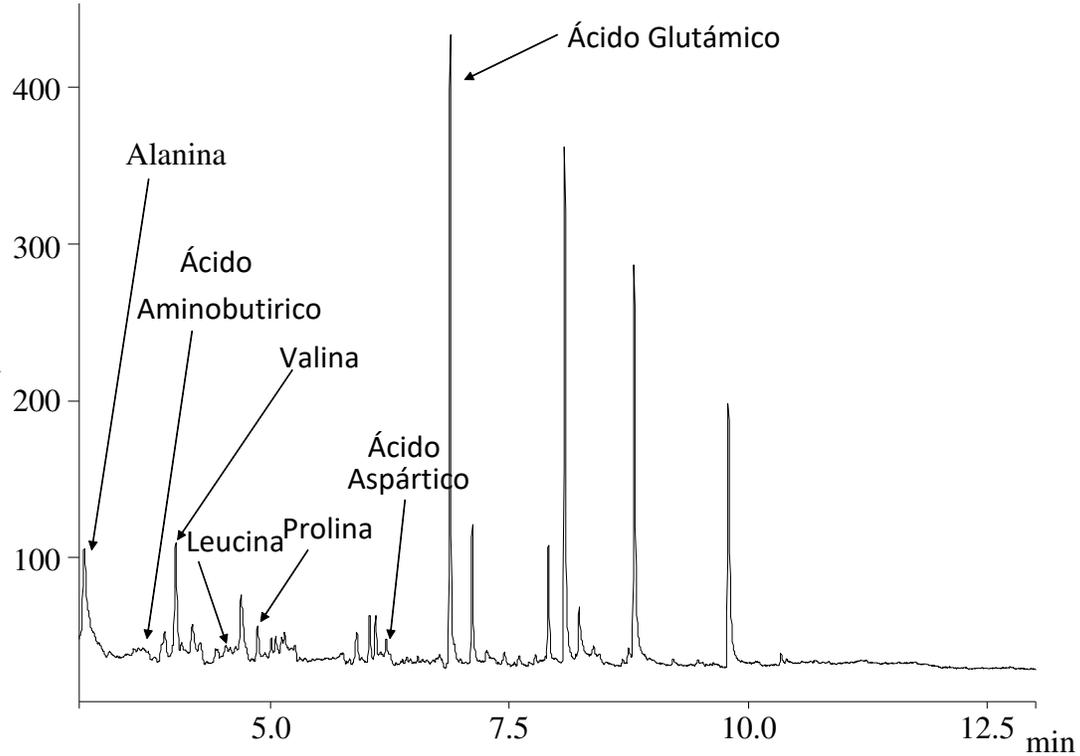


Figura 3. Típico cromatograma GC-MS (TIC, m/z 60-300) obtenido en el análisis de muestras de biomasa de *B. cereus* control después de la derivatización con metil cloroformato.

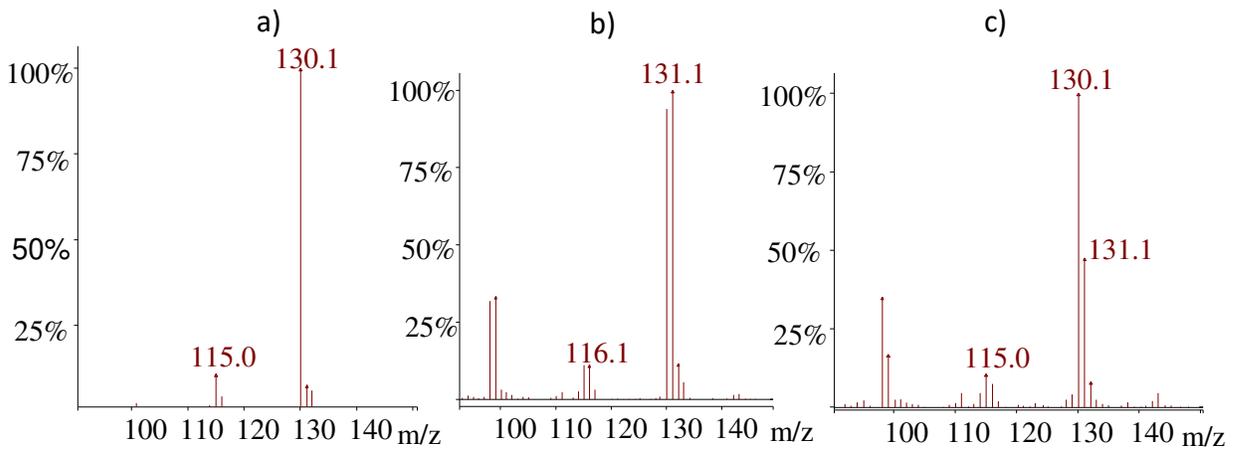


Figura 4. Espectros de masas de a) estándar de valina ( $^{14}\text{N}$ ), b) mezcla de las muestras de *B. cereus* control ( $^{15}\text{N}$ ) plus cultivo con 0 mg/L de Cr(VI) ( $^{14}\text{N}$ ), c) mezcla de muestra control con el cultivo expuesto a 5 mg/L de Cr(VI) en  $^{14}\text{N}$ .

En la Figura 3 se muestra a manera de ejemplo un cromatograma TIC obtenido para la muestra control. Los aminoácidos identificados fueron alanina, ácido aminobutírico, valina, leucina, isoleucina, prolina, ácido glutámico y ácido aspártico. Los tiempos de retención (RT) para cada aminoácido se muestran en la Tabla 3.

Una vez que se identificaron los aminoácidos, se obtuvieron espectros de masas a partir de sus señales cromatográficas. A manera de ejemplo, en la Figura 4 se presentan espectros obtenidos para el derivado de valina. La Figura 4a corresponde al estándar de este compuesto y se observa el ion mayoritario con  $m/z$  130.1 debido a la presencia de 99.63%  $^{14}\text{N}$ . En la Figura 4b, el espectro de valina presenta dos señales de la intensidad prácticamente idéntica; este espectro corresponde al cromatograma de la mezcla del cultivo control ( $^{14}\text{N}$ , ion mayoritario del derivado de valina  $m/z$  130.1) con el cultivo no expuesto a Cr(VI) pero obtenido agregando al medio  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (ion mayoritario  $m/z$  131.1). Se observa que las intensidades de ambos iones son prácticamente iguales, lo que demuestra que se mezclaron las mismas cantidades de células de muestras expuestas y control, ya que ambos cultivos fueron obtenidos en ausencia del agente estresante. Cabe mencionar, que este es uno de los puntos críticos del marcaje diferencial y es muy importante asegurar el mezclado de iguales cantidades de biomasa de cada una de las muestras que se pretenden comparar. Finalmente, en la Figura 4c, se observa una mayor intensidad del ion 130.1 respecto al 131.1. Este espectro del derivado de valina corresponde a la mezcla de cultivo expuesto a 5 mg/L Cr(VI) con el cultivo control y la diferencia de intensidades indica claramente que, bajo el estrés abiótico impuesto por el Cr(VI) la concentración de valina libre en *B. cereus* aumentó en comparación con el cultivo control.

Con el fin de evaluar el efecto del Cr(VI) sobre la concentración de aminoácidos libres en *B. cereus*, a partir de los cromatogramas obtenidos para todas mezclas se calcularon las razones entre las intensidades de los iones mayoritarios que contenían nitrógeno en su estructura ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 5.

Tabla 3. Relación de las intensidades de los iones característicos (con nitrógeno en su estructura) de los aminoácidos encontrados en las muestras.

Concentración de Cr(VI) mg/L			0		2.5		5		10	
TR	AA	Ion ( <sup>14</sup> N/ <sup>15</sup> N)	Media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
3.059	Alanina	102/103	0.300	0.006	0.265	0.028	1.079	0.122	0.553	0.247
3.672	Ácido aminobutírico	116/117	0.454	0.067	0.594	0.237	1.745	0.700	1.186	0.197
4.012	Valina	130/131	0.285	0.023	0.280	0.095	0.944	0.154	0.790	0.284
4.537	Leucina	144/145	1.314	0.171	1.811	0.615	1.819	0.087	2.559	0.341
4.71	Isoleucina	144/145	1.185	0.267	0.963	0.178	1.449	0.204	1.133	0.175
4.864	Prolina	128/129	0.914	0.076	0.847	0.085	0.998	0.047	0.836	0.117
6.213	Ácido aspártico	188/189	1.589	0.203	1.733	0.283	1.154	0.231	1.424	0.260
7.218	Ácido glutámico	202/203	1.668	0.136	1.991	0.119	1.448	0.179	1.787	0.226

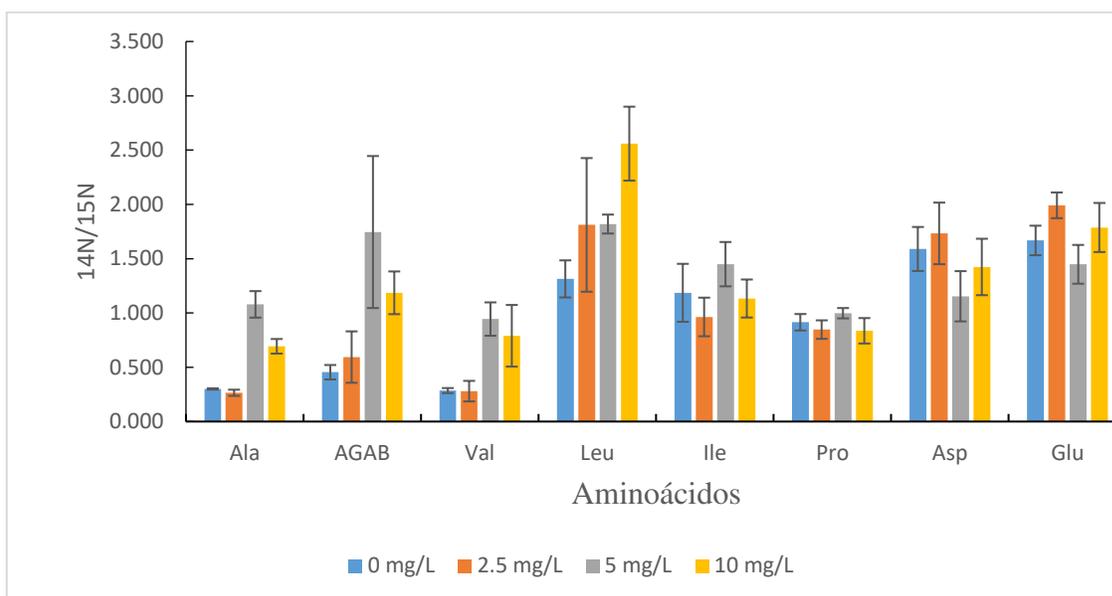


Figura 5. Representación gráfica del efecto de diferentes concentraciones de Cr(VI) sobre el cambio de la concentración de aminoácidos libres en cultivo de *B. cereus*. Se presentan los resultados promedio junto con la desviación estándar evaluados con base en tres réplicas.

Con el fin de hacer una comparación estadística entre las medias de relaciones isotópicas obtenidas para cada uno de los aminoácidos a diferentes concentraciones de Cr(VI), se llevó a cabo una prueba de Tukey con el nivel de confianza 95% y los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Prueba de Tukey (nivel de confianza 95%). La misma letra para diferentes concentraciones indica que no se encontró una diferencia significativa entre ellas.

Alanina		A. aminobutírico		Valina		Leucina	
0 mg/L	C	0 mg/L	B	0 mg/L	B	0 mg/L	A
2.5 mg/L	C	2.5 mg/L	B	2.5 mg/L	B	2.5 mg/L	A
5 mg/L	A	5 mg/L	A	5 mg/L	A	5 mg/L	A
10 mg/L	B	10 mg/L	AB	10 mg/L	A	10 mg/L	A
Isoleucina		Prolina		Aspartato		A. glutámico	
0 mg/L	A	0 mg/L	A	0 mg/L	A	0 mg/L	AB
2.5 mg/L	A	2.5 mg/L	A	2.5 mg/L	A	2.5 mg/L	A
5 mg/L	A	5 mg/L	A	5 mg/L	A	5 mg/L	B
10 mg/L	A	10 mg/L	A	10 mg/L	A	10 mg/L	AB

Con ayuda de la Tabla 4 y la Figura 5, podemos observar que para alanina, ácido aminobutírico y valina ocurrió un incremento significativo de sus concentraciones en cultivos expuestos a 5 mg/L de Cr(VI) con respecto al cultivo control y las demás condiciones de exposición a cromo hexavalente; sin embargo, para leucina, isoleucina, prolina, ácido aspártico y ácido glutámico no hubo diferencia significativa entre sus concentraciones entre el cultivo control y los cultivos expuestos a Cr(VI).

#### 4.1.5 Conclusiones

Se desarrolló un procedimiento semicuantitativo para evaluar el efecto del Cr(VI) agregado al medio de cultivo sobre las concentraciones de aminoácidos intracelulares en *B. cereus*. Para ello, se llevó a cabo el marcaje diferencial de los aminoácidos *in vivo*, mediante uso de  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  como componente del medio de cultivo mínimo para bacterias expuestas al agente estresante y el uso de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , en medios donde crecieron bacterias controles. Se demostró

que, al obtener las mezclas de cultivos que crecieron en presencia de  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , en los espectros de masa de cada uno de los aminoácidos aparecen dos señales del mismo ion, pero proveniente de dos cultivos ( $\Delta m/z = 1$ ). A partir del análisis GC-MS de los extractos de aminoácidos derivatizados con metil cloroformato (kit EZ:faast), en los cultivos de la bacteria se identificaron: alanina, ácido aminobutírico, valina, leucina, prolina, aspartato y ácido glutámico. Asegurando la misma cantidad de células de cultivo expuesto y control en cada una de las mezclas analizadas por GC-MS, se obtuvieron las relaciones de intensidades entre los iones mayoritarios en el espectro de cada uno de los aminoácidos, correspondientes al cultivo expuesto y control ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ )

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de 5 mg/L Cr(VI) en el medio de cultivo provocó un aumento significativo de la concentración intracelular de alanina, ácido aminobutírico y valina en *B. cereus*.

4.2 Determinación de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina en diferentes matrices químicas por cromatografía de alta resolución acoplada mediante electro nebulización a espectrometría de masas con trampa de iones utilizando monitoreo de reacciones múltiples (HPLC-ESI-ITMS/MS).

#### 4.2.1 Introducción.

Las poliaminas (PA's) son pequeñas moléculas alifáticas con múltiples grupos amino, productos del metabolismo de los seres vivos y por lo tanto pueden encontrarse en alimentos y muestras medioambientales. Entre las poliaminas más importantes debido a su papel en el crecimiento, división y diferenciación celular además de estar involucradas en mecanismos de defensa contra estrés ambiental figuran la putrescina, cadaverina, espermidina y espermina (Figura 6)[61, 62].

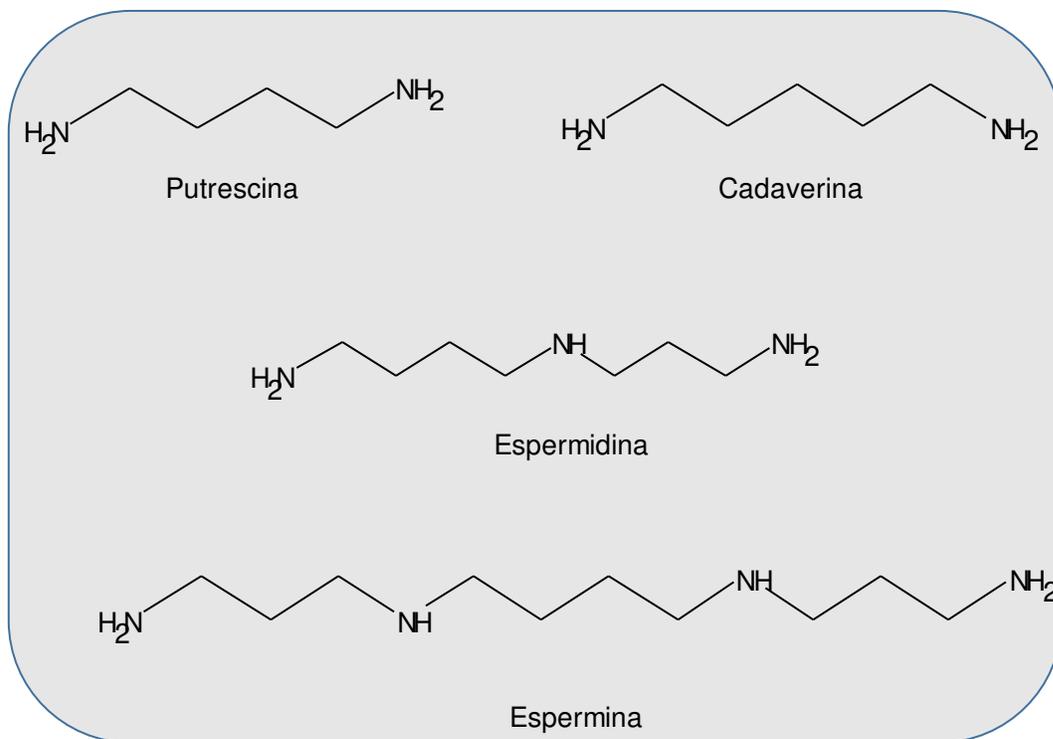


Figura 6. Estructuras de las poliaminas analizadas.

Específicamente en plantas, la señalización mediante poliaminas está directamente conectada con diferentes rutas metabólicas contribuyendo a la tolerancia de las plantas hacia el estrés abiótico; como ejemplo, se ha señalado la participación de las poliaminas en la señalización de especies reactivas de oxígeno, generación de óxido nítrico, modulación de la actividad de canales de iones y la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>[63].

La importancia que tienen las PA's en el humano tiene dos aspectos: 1) su importancia clínica, es decir como un posible biomarcador en ciertos padecimientos y 2) su contenido en alimentos como nutrientes o como indicadores de putrefacción.

En el primer caso hay evidencia que relaciona a la ornitina descarboxilasa (ODC - enzima que descarboxila a la ornitina para llegar a la putrescina) con la transformación de diferentes líneas celulares, ya sea sola o en combinación con otros oncogenes. Estos experimentos demostraron que la actividad de la ODC es suficiente para la promoción de tumores[64].

En otro caso, las complicaciones que acompañan a la diabetes están relacionadas con la hiperglicemia y en consecuencia con la glicación de grupos aminos por especies reactivas de oxígeno. Bajo este contexto es que las poliaminas se perfilan como importantes agentes inhibidores de la glicación, a su vez, también pueden actuar como trampas de radicales libres y ésta puede ser una de las funciones que desempeña la espermidina en el núcleo celular[65].

En cuanto el papel de las PA's en la dieta, cabe mencionar que la cantidad de estos compuestos que se ingiere con los alimentos sobrepasa su cantidad generada endógenamente, por lo que las fuentes dietéticas de poliaminas ayudan mantener un metabolismo. Este punto cobra más importancia si añadimos el hecho de que con el aumento de la edad la síntesis de poliaminas y proteínas relacionadas con su síntesis suele disminuir[66]. Por otro lado, un alto contenido de poliaminas en alimentos es indicativo del deterioro de los mismos, principalmente, debido a la actividad microbiana[67].

Debido a lo expuesto anteriormente, existe una gran demanda de procedimientos analíticos confiables para la detección y cuantificación de estas PA's en diferentes matrices químicas. Para la evaluación de PA's en muestras sólidas, es necesaria una extracción, la cual puede llevarse a cabo usando una solución acuosa acidificada con ácido perclórico, tricloroacético o clorhídrico con o sin algún porcentaje de metanol. En el caso de que sean muestras líquidas es común la precipitación de proteínas, filtración, centrifugación y preconcentración[68, 69].

La instrumentación utilizada para el análisis de PA's suele involucrar cromatografía de líquidos con detectores ópticos o acoplados a espectrometría de masas[69]. A la hora de utilizar cromatografía de líquidos, una estrategia común es la derivatización pre-columna para mejorar la separación en fase inversa y conferir las propiedades que permitan una detección más específica. Esta derivatización consiste en una modificación química que en una primera instancia hace más apolares a los analitos y hace mejor su detección mediante espectrofotometría UV/Vis o por medio de detección fluorimétrica. Entre los reactivos más utilizados para la derivatización de grupos aminos se encuentra el cloruro de dansilo, cloruro de benzoílo, cloruro de dabsilo, o-ftaladehído, 9-fluorometil cloroformiato (FMOC) y 6-aminoquinolil-N-hydroxisuccinimidil carbamato (AQC)[68-71].

El objetivo de este estudio fue establecer un procedimiento para la determinación de putrescina, cadaverina, espermidina y esperminas libres en diferentes matrices biológicas de

interés. Para este fin se utilizó una cromatografía de líquidos fase inversa acoplado a una trampa de iones por medio de electro nebulización como fuente de ionización (HPLC-ESI-ITMS/MS). Para derivatizar las PA's se utilizó 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoruro (FNBT). El FNBT ha sido reportado anteriormente para la determinación de poliaminas libres en extractos de plantas y en muestras clínicas por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica y fluorimétrica[72-74]; no obstante, las posibles ventajas que ofrece en espectrometría de masas no han sido exploradas. En este trabajo, la cuantificación fue llevada a cabo utilizando monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La factibilidad del procedimiento propuesto fue demostrado al analizar extractos de plantas y muestras de orina de humanos.

#### 4.2.2 Objetivo particular.

Desarrollar un procedimiento por medio de HPLC-ESI-ITMS/MS para la cuantificación de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina en diversas muestras biológicas.

#### 4.2.3 Condiciones experimentales.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un desgasificador, un compartimento con termostato para columna y un automuestreador. Este equipo fue acoplado en línea a una trampa de iones (ITMS) por medio de una fuente de ionización ESI (Bruker Daltonics). El sistema HPLC-ESI-ITMS fue controlado por el programa Hystar V3.2 y los datos fueron procesados por el programa DataAnalysis V4.1 SP2 y QuantAnalysis V2.0 SP2. La columna cromatográfica usada fue una Luna C18 (150 x 2 mm, 3 µm) con una precolumna (4 x 2 mm), ambos de la marca Phenomenex.

Se utilizó también un espectrómetro de masas de alta resolución con ionización por electro nebulización ESI-QTOFMS equipado con el programa Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics).

Todos los reactivos fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich); metanol grado HPLC, dimetil sulfoxido (DMSO), diclorometano, hexano, dicloruro de putrescina (PUT), dicloruro de cadaverina (CAD), trihidrocloruro de espermidina (SPD), tetrahidrocloruro de espermina (SPM) y 1,6-diaminohexano, cloruro de cadmio (Cd(II)), ácido fórmico, ácido clorhídrico y los componentes del medio hoagland.

Las soluciones de las PA's fueron preparadas en agua desionizada disolviendo apropiadamente alícuotas de dihidrocloruro de putrescina, dihidrocloruro de cadaverina, trihidrocloruro de espermidina, tetrahidrocloruro de espermina (100, 100, 150 y 200 µg/mL respectivamente); se usó una solución de 1,6-diaminohexano como estándar interno (IS) con una concentración de 300 µg/mL. El reactivo de derivatización, preparado antes de su uso, se obtuvo diluyendo 300 µL de FNBT en 10 mL de DMSO. También se preparó una solución 2 M de hidróxido de sodio.

Para el procedimiento de derivatización, las soluciones estándar fueron colocadas en un tubo eppendorf (1.5 mL), después se le adicionó 50 µL de hidróxido de sodio 2M y 200 µL de FNBT. La muestra fue agitada e incubada a 60 °C durante 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente, se extrajeron las PA's derivatizadas con 1 mL de hexano; la muestra fue centrifugada a 13,000 g durante 5 minutos, la fase orgánica fue recuperada y evaporada al vacío a 30 °C. Finalmente, el residuo amarillo fue redisolto en 1 mL de fase móvil.

Las semillas de *Lepidium sativum* cv. *Ogrodowa* fueron obtenidas de una tienda especializada en jardinería en Polonia. Las semillas fueron esterilizadas (70% etanol, 3 min; 3.1 de hipoclorito de sodio, 15 min) y lavadas en agua desionizada por 1 hora y después fueron germinadas en medio Hoagland durante 5 días. Las plántulas obtenidas fueron divididas en 5 grupos (cerca de 100 semillas por grupo); cada grupo fue crecido hidropónicamente durante dos semanas usando una solución Hoagland adicionada con 0, 5, 20, 50 o 100 mg/L de Cd(II). Finalmente, las plantas se cosecharon y se lavaron con cloruro de calcio 0.05 M y con agua desionizada. La biomasa fue liofilizada y homogenizada.

La primera orina de la mañana fue colectada de 6 personas saludables, seis personas recientemente diagnosticadas con diabetes y seis pacientes diabéticos que presentaban severas complicaciones (retinopatía proliferativa, neuropatía severa y daño renal). Estas muestras formaron parte de un estudio clínico llevado a cabo por el Departamento de Ciencias Médicas (Ma. E. Garay-Sevilla, datos no publicados). Dicho estudio clínico fue aprobado por el comité de ética del departamento de Ciencias Médicas (No. 2012-05). Todos los sujetos dieron su consentimiento.

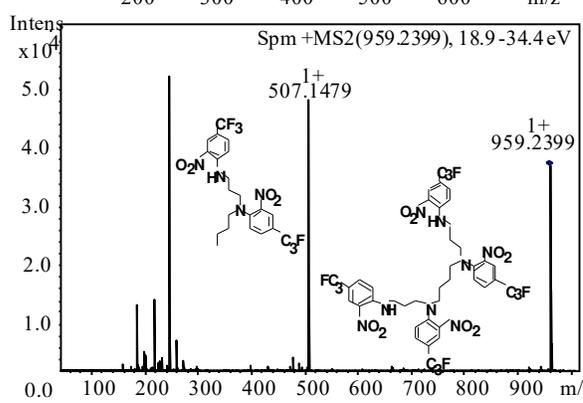
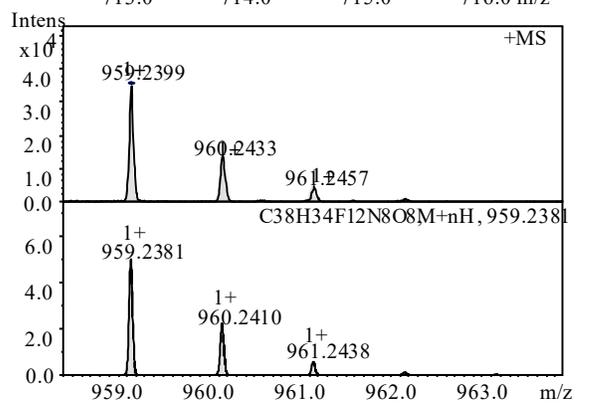
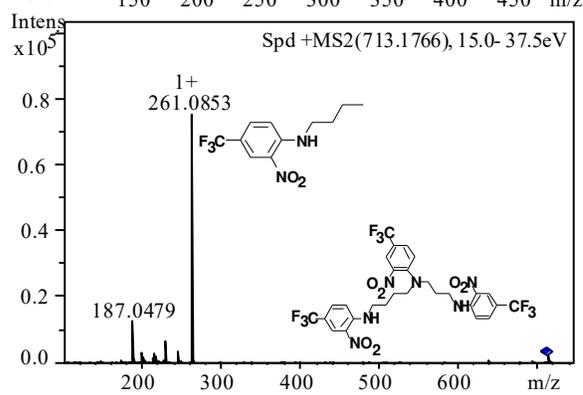
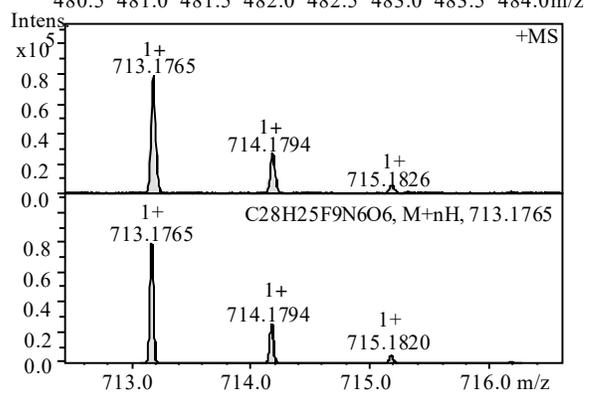
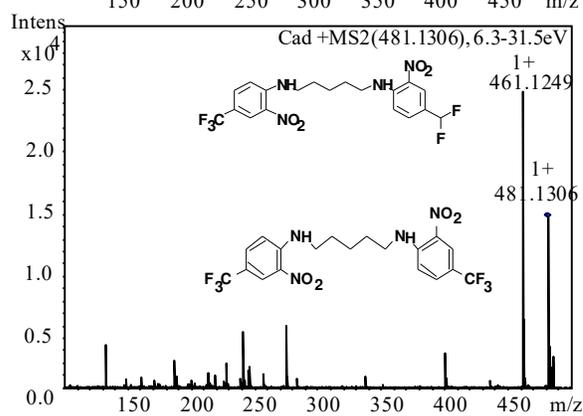
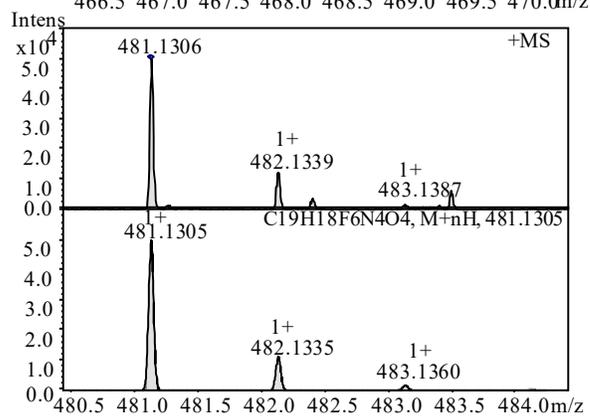
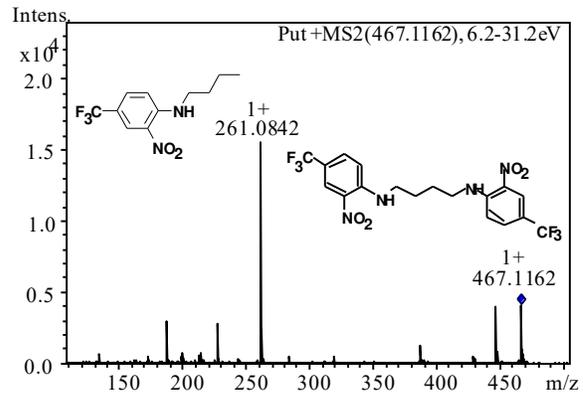
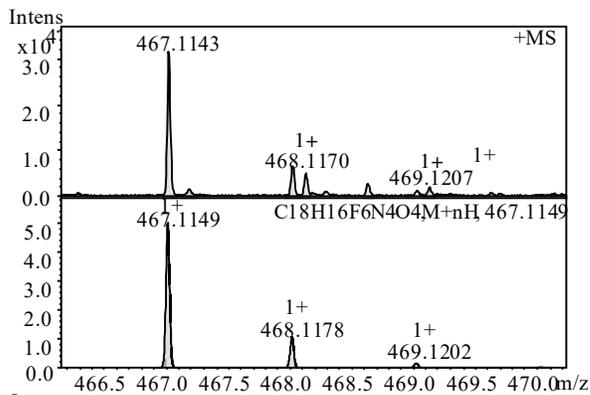
#### 4.2.5 Resultados y discusión.

Como compuestos polares y de baja masa molecular, las poliaminas son adecuadas para ser analizadas por ESI-MS, sin embargo, su retención en columnas de fase inversa es un problema. Para la determinación de PA's no derivatizadas, algunos autores usan bajas concentraciones (0.05-0.1%) de ácido heptafluorobutírico para formar pares iónicos[75, 76]; con este enfoque sin embargo, la supresión de la ionización de los analitos de interés y la formación de diversos aductos pueden causar una pérdida de sensibilidad. Por otro lado, la derivatización pre-columna ofrece importantes ventajas en el análisis de PA's por LC-MS[77]: primero, los derivados ahora menos polares son extraídos de la muestra original, lo cual es benéfico en términos de una reducción de posibles interferencias y concentración del analito; segundo, los derivados obtenidos pueden ser separados en columnas de fase reversa compatible con la fuente ESI y son menos susceptibles a la formación de aductos. En este trabajo, el FNBT ha sido usado como agente derivatizante. A diferencia de los alquil cloroformatos usados comúnmente en LC-MS[78, 79], el FNBT solo reacciona con grupos amino promoviendo de esta forma una extracción selectiva de *N*-2'-nitro-4-trifluorometilfenil poliaminas (NTP-poliaminas) a la fase orgánica.

En una primera instancia cada una de las PA's derivatizadas (incluyendo la 1,6-diaminohexano que fue utilizada como estándar interno con el objetivo de corregir los errores de dilución y extracción) fueron sometidas a un análisis por medio de infusión al ESI-QTOFMS con el objetivo de corroborar que las reacciones de derivatización se llevaron a cabo. El equipo se operó en modo positivo con un voltaje de nebulización de 4500 V, un flujo de gas de secado de 3 L/min con una temperatura de 180 °C y presión de nebulización de 0.3 bar. Los espectros fueron adquiridos en un intervalo de *m/z* 50-1000; en modo MS/MS. Bajo estas condiciones se obtuvieron los espectros mostrados en la figura 7.

Con este experimento, además de confirmar la identidad de los analitos derivatizados (Figura 7), se obtuvo evidencia de que las PA's fueron derivatizadas en su totalidad y no parcialmente.

Para la separación de las poliaminas en fase inversa, se estableció un gradiente de elución usando ácido fórmico al 0.1% (-A) y metanol(-B) como fases móviles.



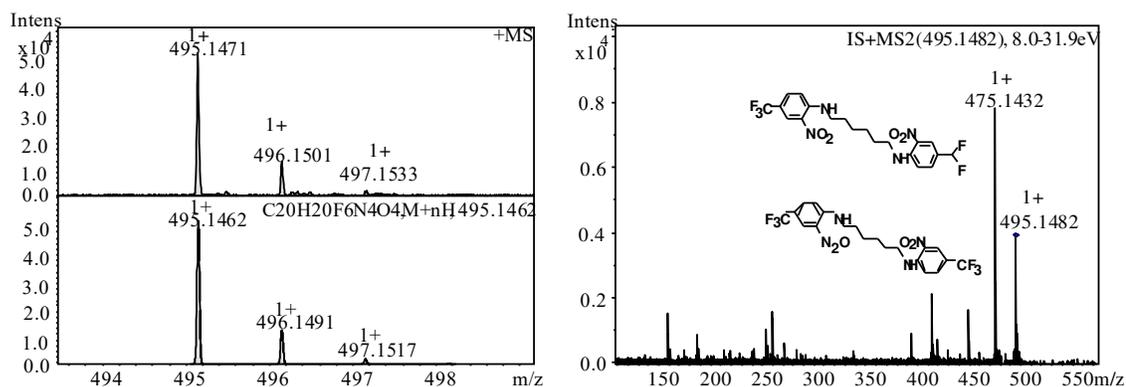


Figura 7. Patrones isotópicos experimentales y teóricos de las moléculas completamente derivatizadas protonadas (panel izquierdo) y los respectivos patrones de fragmentación (panel derecho) obtenidos por infusión directa de los estándares al sistema ESI-QTOFMS y MS/MS.

Este gradiente empezó con 88% de B y continuó así hasta el minuto 5, del minuto 5 al 7 el porcentaje de B se incrementó hasta un 98% y se mantuvo así hasta el minuto 10 y del minuto 10 al 11 volvió a un 88% de B agregando 5 minutos de equilibrio. El flujo que se utilizó fue de 0.2 mL/min y se usó un termostato para la columna a 35 °C. El efluente de la columna fue introducido a la fuente ESI operada en modo positivo con un voltaje de nebulización de 3500 V, voltaje del plato de 500 V, presión del gas nebulizador 1.1 bar (N<sub>2</sub>), gas de secado 6 L/min (N<sub>2</sub>), temperatura de la fuente 200 °C y un voltaje de salida del capilar de 140 V.

Los espectros se obtuvieron en modo UltraScan en el intervalo de m/z 100-1000 con un control de carga de iones (ICC) de 100 000, un tiempo de acumulación máximo de 70 ms, dos medias por experimento y un “Rolling averaging” de dos. El instrumento fue calibrado con la mezcla de tuning ESI-MS(Agilent).

Una vez separadas las PA's se establecieron segmentos de tiempo, donde en cada segmento se optimizaron los parámetros para obtener una mejor detección (señal/ruido) y obtención de espectros. Estos segmentos fueron ordenados de la siguiente manera: del minuto 0 al 5.1 se monitoreó la m/z 467, del 5.1 al 6.2 la 481, del 6.2 al 8.2 la 714 y del 8.2 al 13 la 960. Los tiempos para cada uno de los fragmentos se construyeron de acuerdo con los tiempos de retención obtenidos para PUT, CAD, IS, SPD y SPM, los que fueron 4.70±0.03 min, 5.60±0.04 min, 7.05±0.04 min, 7.65±0.05 min y 10.70±0.05 min, respectivamente. Para cada

segmento de tiempo se varió la amplitud de fragmentación en el intervalo de 0.6-1.8 V y las intensidades de las transiciones más abundantes fueron registradas de la siguiente manera:  $m/z$  260.9 y 447.1 para PUT, 461.1 y 227.9 para CAD, 475.1 y 414.2 para IS, 260.9 y 420.7 para SPD, 507.2 y 899.3 para SPM. Las amplitudes seleccionadas fueron 0.8 para PUT, 0.6 para CAD y 1 para IS, SPD y SPM (Figura 8). En la Tabla 5, se presentan las condiciones finales de MRM y la Figura 9 muestra un típico cromatograma obtenido de una solución de la mezcla de los estándares (panel derecho) junto con los espectros de fragmentación (panel izquierdo). Es necesario aclarar que los espectros de MS/MS obtenidos por ESI-ITMS/MS y ESI-QTOFMS/MS fueron diferentes debido a las diferentes condiciones de fragmentación aplicadas en ambos sistemas (menor energía y helio en la trampa de iones contra argón en la CID de ESI-QTOFMS).

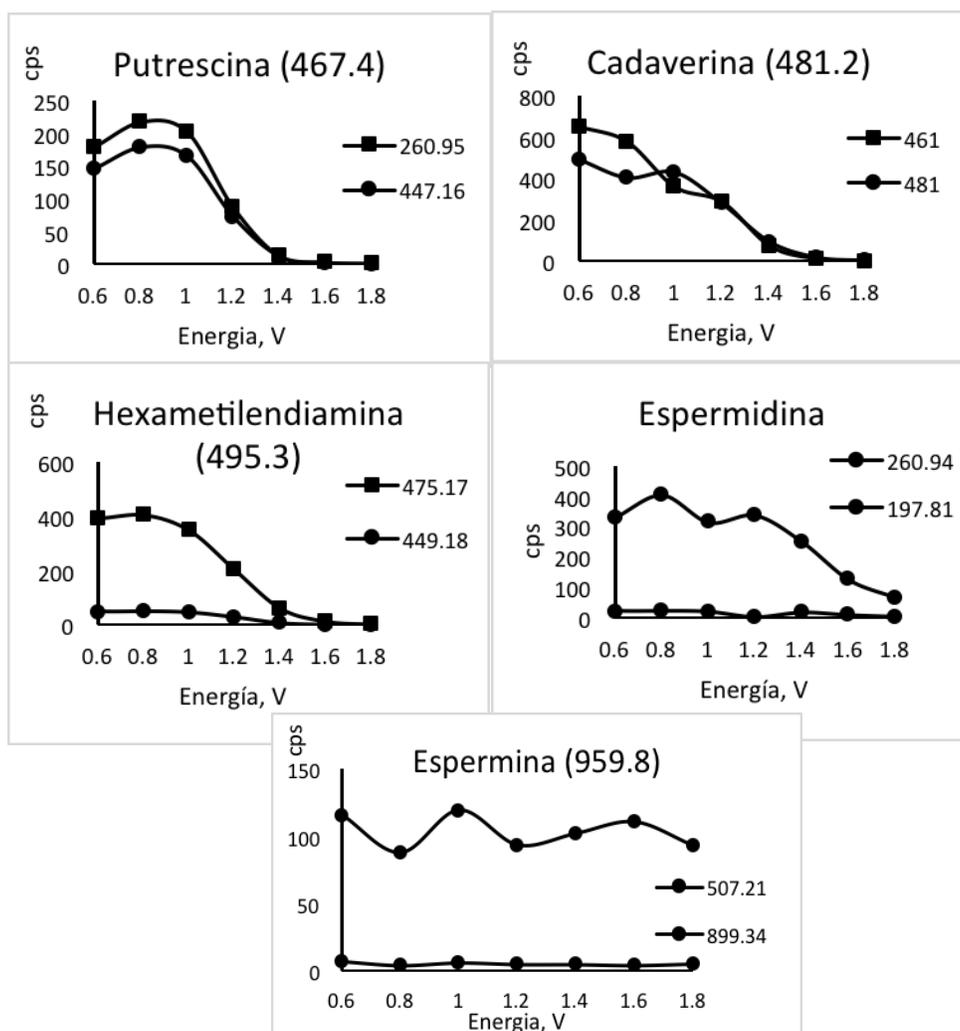


Figura 8. Intensidades de las dos transiciones más abundantes en cada estándar contra las diferentes amplitudes de fragmentación evaluadas.

Tabla 5. Parámetros establecidos para la cuantificación de poliaminas por monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

PA´s *	$t_{ret} \pm SD,$ min	Adquisición , min	Amplitud de fragmentación, V	Precursor ion, $m/z$	Cuantificador ion, $m/z$	Cualificador ion $m/z$
PUT	$4.70 \pm 0.03$	0 – 5.1	0.8	467.1	260.9	447.1
CAD	$5.60 \pm 0.04$	5.1 – 6.2	0.6	481.1	461.1	227.9
IS	$7.05 \pm 0.04$	6.2 – 8.2	1.0	495.1	475.1	414.2
SPD	$7.65 \pm 0.05$	6.2 – 8.2	1.0	713.2	260.9	420.7
SPM	$10.70 \pm 0.05$	8.2 – 13.0	1.0	959.2	507.2	899.3

\* PUT-putrescina; CAD-cadaverina; IS-1,6-diaminohexano; SPD-espermidina; SPM-espermina.

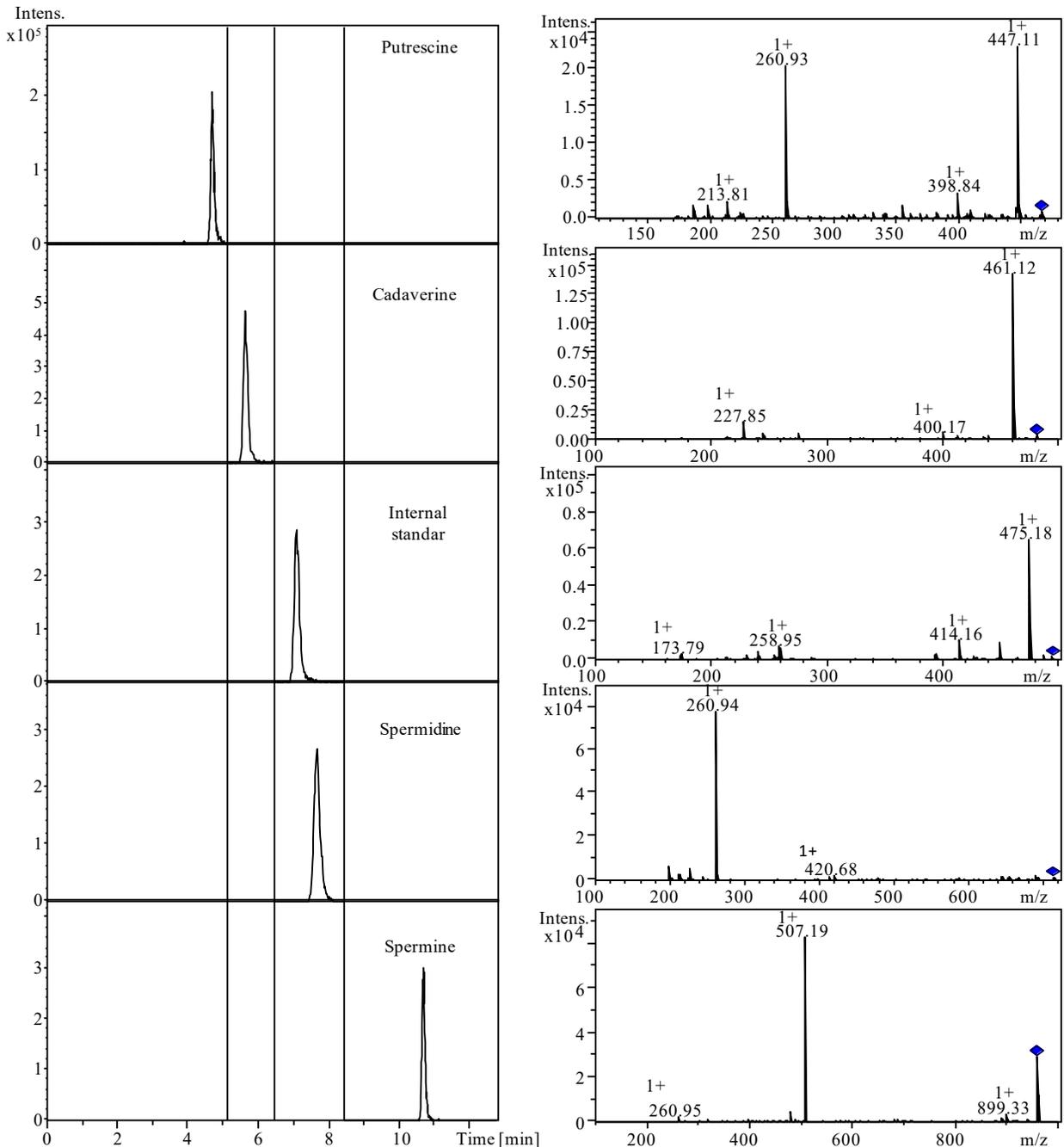


Figura 9. Típico cromatograma de una mezcla de estándares (250 ng de cada poliamina) obtenido en modo MRM (panel izquierdo) y el espectro de fragmentación obtenidos en HPLC-ESI-ITMS.

Se realizaron seis procesos de calibración independientes; las y las funciones de regresión lineal con desviaciones estándar para la pendiente y el intercepto son presentadas en la Tabla 6. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales fueron evaluados en base a la relación señal/ruido; adoptando los criterios de tres y diez desviaciones estándar,

respectivamente (Tabla 6). Los valores obtenidos para el LD y LC son similares a esos reportados en otros estudios llevados a cabo con instrumentación más poderosa (LDs 0.1-5 ng/mL usando un triple cuadrupolo sin derivatización de PA's[68]; LCs 0.1-5 ng/mL usando triple cuadrupolo e isobutil cloroformiato como agente derivatizante[71], LDs, 0.23-2.9 fmol usando QTOF y cloruro de benzoílo como derivatizante)[80].

Tabla 6. Funciones de regresión lineal evaluadas para seis procesos de calibración independiente y los límites de cuantificación y detección.

Poliamina	Regresión lineal		R <sup>2</sup>	LD,	LD,	LC,	LC,
	Pend. (x 10 <sup>-3</sup> )	intercepto		fmol	ng/ml	fmol	ng/ml
Putrescina	5.22 (0.10)	0.053 (0.017)	0.9979(0.0016)	1.84	0.081	6.07	0.267
Cadaverina	13.10 (0.89)	0.098 (0.026)	0.9994(0.0004)	0.73	0.039	2.41	0.129
Espermidina	6.64 (0.22)	0.048 (0.022)	0.9997(0.0004)	0.62	0.045	2.05	0.149
Espermina	4.47 (0.40)	0.014 (0.009)	0.9995(0.0005)	2.14	0.215	7.06	0.710

Con el objetivo de demostrar que el procedimiento propuesto es capaz de detectar diferencias entre el contenido de PA's en plantas expuestas a estrés abiótico con respecto a aquellas del grupo control, se obtuvieron cultivos hidropónicos de *Lepidium sativum* bajo exposición a diferentes concentraciones de Cd(II) y se analizó la biomasa obtenida en cada uno de los casos. La composición química de los extractos de planta suele interferir en el análisis por HPLC-ESI-ITMS, por lo que se realizó una limpieza del extracto previo a la derivatización. Para eliminar componentes de baja polaridad de la muestra (como fosfolípidos), se hizo una extracción con diclorometano. Una vez llevada a cabo la reacción de derivatización se realizó una extracción con hexano de las PA's considerando que hay especies polares e iónicas que afectarían la ionización de los analitos. Para revisar los efectos de matriz, se compararon las pendientes de curvas de calibración realizadas en presencia de matriz de muestra con las de las soluciones de calibración acuosas; para esto se utilizó las muestras provenientes de las plantas expuestas a 50 mg/L de Cd(II). La supresión/mejora de señal (SSE) fue calculada como la relación entre las pendientes de las funciones lineales obtenidas de la calibración sobre las muestras y la calibración con soluciones acuosas. Como se muestra en la tabla 7, los valores de SSE estuvieron en el intervalo de 86.1-115.4, lo cual indica que la matriz química no tuvo efecto importante sobre la relación entre la concentración del analito y su

señal analítica normalizada con el IS. Basado en las seis calibraciones independientes y los procedimientos de adición de estándar, se evaluó la desviación estándar relativa para cada SSE; como puede ser observado en la Tabla 7, la RSD fue siempre <15%, indicando que el procedimiento es apto para la cuantificación de los cuatro analitos[76]. La relación entre las intensidades del IS en la muestra y en las curvas de calibración fue de 103% con RSD de 5.3% ( $n=6$ ). Sin embargo, si no se incluye el paso de la limpieza, los valores de SSE para todas las poliaminas presentan grandes discrepancias de hasta un 100%. Para espermina que eluye al final de la corrida cromatográfica y fue susceptible a interferencias de matriz debido a componentes de baja polaridad, el valor de SSE fue de 60.1% sin extracción con diclorometano contra un 86.7% después de la extracción. Para los experimentos de porcentaje de recobro, se adicionaron dos alícuotas de los estándares de calibración a las muestras (50 y 100 ng de cada uno de analitos en 50 mg de muestra) obteniéndose los resultados indicativos de una exactitud aceptable (Tabla 7). Finalmente, en esta misma tabla 7 se presentan los límites de detección y cuantificación; los valores corresponden a la relación señal / ruido obtenido bajo el criterio de tres y diez desviaciones estándar, respectivamente. Cuando expresamos el LD en ng de poliamina por mL de extracto de planta, los valores estuvieron en el intervalo de 1.7 – 2.8 ng/mL, similar a los reportados (0.2-9.9 ng/mL) empleando ácido heptafluorobutírico como formador de pares iónicos, IS marcado isotópicamente ( $^{13}\text{C}_4$  1,4-diaminobutano) y un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo[68].

En la Figura 10, son presentados los resultados de la determinación de PA's en plantas bajo diferentes concentraciones de Cd(II) utilizado como promotor de estrés abiótico. Las medias de las concentraciones encontradas en los diferentes grupos de plantas fueron comparadas estadísticamente usando una prueba t-test ( $p<0.05$ , Microsoft Excel 2010). Como se puede observar, la putrescina incrementó significativamente en la planta en presencia de 20 y 50 mg/L de Cd(II) respecto plantas no expuestas, mientras las concentraciones de las otras 3 poliaminas decrecieron desde la presencia de la concentración más baja de Cd(II) (5 mg/L en el medio) con una tendencia a recuperar sus niveles basales a partir de 50 mg/L de Cd(II). El rol de las poliaminas como moléculas señalizadoras en la defensa de plantas al estrés producido por cadmio ha sido demostrado en algunos estudios[81]. La acumulación de putrescina libre y conjugada ha sido asociada al incremento de la actividad de la arginina

descarboxilasa y ornitina descarboxilasa además de la disminución de la actividad de la diamina oxidasa[82]. Por otro lado, la putrescina es un precursor de otras poliaminas que juegan un rol como antioxidantes necesarios para combatir el daño ocasionado por el daño oxidativo inducido por el Cd(II). En cuanto al decremento de las concentraciones de espermina y espermidina, se ha observado en diferentes sistemas experimentales, que aun a tiempos largos de exposición o bajo severas condiciones de estrés, esta supresión tiende a revertirse[83-85]. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo son consistentes con el conocimiento actual sobre las poliaminas libres en plantas bajo estrés abiótico, demostrando que el procedimiento propuesto ofrece poder de detección y sensibilidad requerida para evaluar cambios en las concentraciones de PA's en plantas bajo estrés abiótico.

Tabla 7. Parámetros de validación para el procedimiento propuesto para la aplicación en extractos de plantas.

	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
<i>Efecto de matriz (calibración con seis replicas en solución acuosa y adición de estándar)</i>				
Pend., calibración	5.222x10 <sup>-3</sup>	13.10x10 <sup>-3</sup>	6.641x10 <sup>-3</sup>	4.467x10 <sup>-3</sup>
Pend, adición de std	6.025x10 <sup>-3</sup>	11.28x10 <sup>-3</sup>	6.629x10 <sup>-3</sup>	3.872x10 <sup>-3</sup>
SSE, %	115.4	86.1	99.8	86.7
RSD%	11	8.5	4.6	8.9
<i>Experimentos de recobro (tres replicas por cada muestra)</i>				
ng en 50mg de muestra	120 ± 7	5.21 ± 0.4	51.5 ± 2.5	2.55 ± 0.4
ng adicionados (1)	50	50	75	20
ng encontrados (1)	182 ± 9	46.2 ± 4.3	143 ± 8	25.8 ± 2.6
Recobro 1, %	107.1	83.7	113.0	114.4
ng adicionados (2)	100	100	112.5	100
ng encontrados (2)	232 ± 11	93.0 ± 8.5	160 ± 9	111 ± 11
Recobro 2, %	105.4	88.4	97.5	108.2
<i>Límites de detección y cuantificación como ng de analito por mg de biomasa seca</i>				
LD, pg/mg	15.4	10.2	13.2	55.6
LC, pg/mg	46.2	30.6	39.7	16.7

Límites de detección y cuantificación como fmol por inyección				
LD, fmol	17.4	9.98	9.08	27.5
LC, fmol	57.4	32.9	30.0	90.8

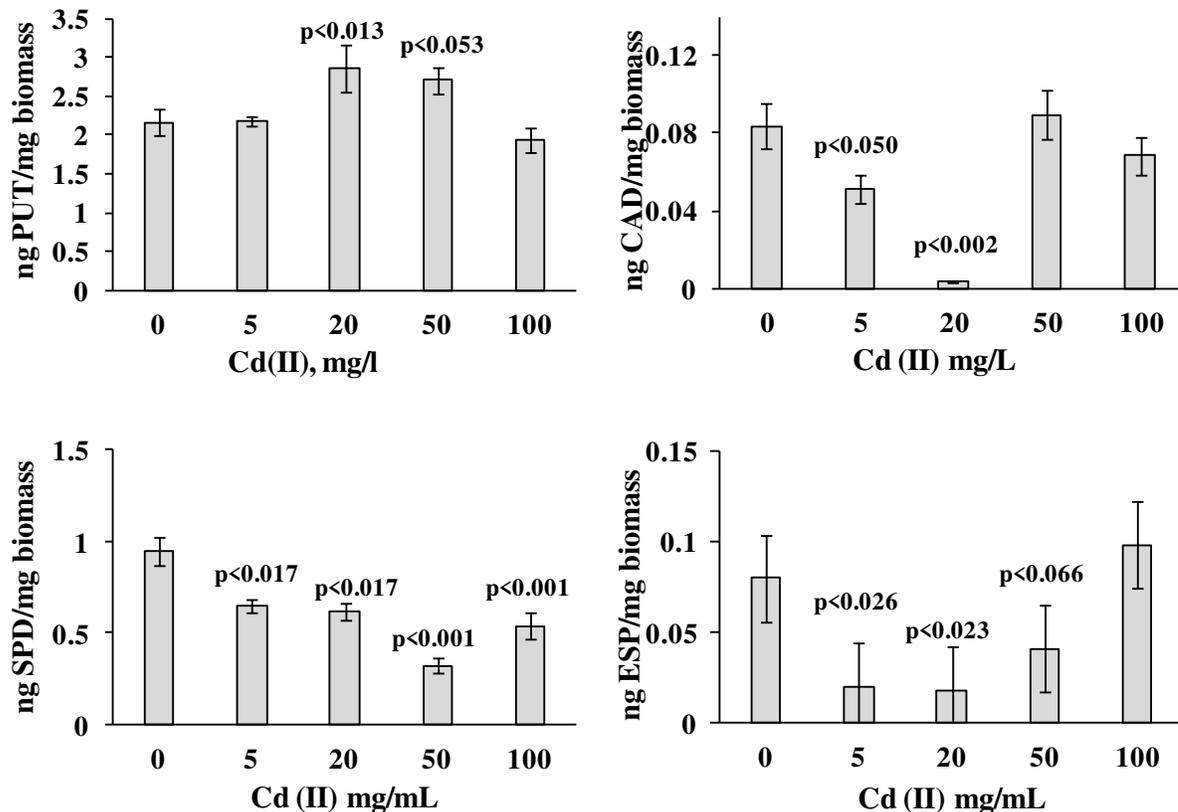


Figura 10. Concentración de las cuatro poliaminas encontradas en *L. sativum* crecida en presencia de diferentes concentraciones de Cd(II) adicionadas al medio de crecimiento. (Se presentan las medias con su respectivo SD, n=3; valores de *p* fueron obtenidos por la comparación de las medias obtenidas en presencia de Cd(II) respecto plantas no-expuestas).

Por otro lado, era importante probar el procedimiento en otra matriz; las poliaminas juegan roles esenciales en muchos procesos celulares y como se había mencionado en la introducción, su metabolismo ha sido relacionado con condiciones fisiopatológicas tales como cáncer y diabetes. Específicamente, en etapas tempranas de la diabetes, la síntesis de

poliaminas aumenta durante la activación de ornitina descarboxilasa en el riñón[86]. Cuando la diabetes transcurre, en etapas más avanzadas se presentan muchas complicaciones como nefropatía, neuropatía, desordenes vasculares entre otros las cuales pueden estar asociadas con la síntesis o catabolismo de las poliaminas. El incremento de las concentraciones de SPD, SPM y PUT encontrado en muestras vítreas de pacientes con retinopatía proliferativa sugieren un potencial rol de PAs como marcadores de esta complicación[87]. Las alteraciones en la concentración PUT y CAD libres en orina han sido reportadas solamente en pocos estudios[88, 89]. Para evaluar la potencial utilidad del procedimiento propuesto, se analizaron muestras de orina de individuos saludables, pacientes diabéticos sin complicaciones y de quienes presentaban severas complicaciones.

En el caso de las orinas, la relación de la supresión/mejora para las cuatro poliaminas estuvo en el intervalo de 80.4-96.7% con una RSD<15%. Para el IS, la relación entre las intensidades de su señal registradas en las muestras respecto las soluciones de calibración fue del 98.5% con una RSD del 3.3% (n=6). De manera similar a como se hizo con las plantas, se realizó una extracción con diclorometano para limpiar la muestra antes de la derivatización. Para evaluar la exactitud, se le adicionaron estándares de las PA's a la orina de individuos saludables (300µL) y en cada uno de los casos, se evaluó el porcentaje de recobro. Los resultados obtenidos fueron en el intervalo de 89.3-108.8%. Los límites de detección y cuantificación del método fueron obtenidos como se describió antes, usando como blanco una orina diluida diez veces. Los valores obtenidos fueron similares a los límites de cuantificación reportados recientemente: 2.5-31.25 ng/mL para PA's no derivatizadas y analizadas en una trampa de iones lineal-triple cuadrupolo[90] o 4.5-45.1 fmol por inyección para PA's no derivatizadas en un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo[91].

Las concentraciones de PAs determinadas en orina de individuos con diferentes condiciones clínicas son presentados en la Tabla 8. Los valores promedios y los intervalos obtenidos para los tres analitos en personas sanas fueron consistentes con los siguientes intervalos: 29.1-69.0 ng/mL PUT, 8.99-236.5 ng/mL CAD, 2.89-30.2 ng/mL SPD mientras para SPM, nuestros datos fueron más bajos comparados al intervalo 136.0-236.7 ng/mL reportado previamente. Las concentraciones de PUT y CAD fueron más altas en pacientes diabéticos que en personas sanas. Una tendencia similar fue observada en un reciente estudio el cual comparó individuos sanos contra pacientes con pie diabético[88]. Sin embargo, para SPM y

SPD no hay datos disponibles para estos analitos libres en orina de pacientes con diabetes progresiva; en este trabajo, la espermidina incrementó en sujetos con diabetes en comparación con aquellos sanos sugiriendo una posible correlación de sus concentraciones con la progresión de esta enfermedad; de manera similar este comportamiento también se observó para PUT y CAD. Por otro lado, la SPM libre permaneció prácticamente invariable entre los tres tipos de muestra. Está bien establecido que las PA's libres son objetivos de la acetilación in vivo; esta modificación baja la carga neta positiva de los compuestos en el ambiente fisiológico facilitando remover cantidades excesivas de PA's acumuladas en las células; así, solo las concentraciones de SPM diacetilada fueron mayores en orina de pacientes con cáncer y este evento fue propuesto como un marcador de esta enfermedad[92]. En consecuencia, se puede esperar que la espermina diacetilada, en lugar de libre, también estaría elevada en los individuos con diabetes.

Como se observa en la tabla 8, la variación entre las PA's en orina fue alta, consistente con reportes de análisis de orina en pacientes con cáncer. Debido a que se incluyeron solamente seis sujetos en cada grupo, los resultados obtenidos no son concluyentes.

Tabla 8. Parámetros de validación para el procedimiento propuesto para la aplicación en orinas

	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
<i>Efecto de matriz (calibración con seis replicas en solución acuosa y adición de estándar)</i>				
Pend., calibración	$5.222 \times 10^{-3}$	$13.10 \times 10^{-3}$	$6.641 \times 10^{-3}$	$4.467 \times 10^{-3}$
Pend, adición de std	$4.407 \times 10^{-3}$	$12.67 \times 10^{-3}$	$5.466 \times 10^{-3}$	$3.588 \times 10^{-3}$
SSE, %	84.4	96.7	82.3	80.4
RSD%	12.5	12.6	5.6	11.0
<i>Experimentos de recobro (tres replicas por cada muestra)</i>				
ng (300 µl de orina)	$32.3 \pm 2.5$	$48.0 \pm 3.1$	$21.7 \pm 2.1$	$82.2 \pm 8.9$
ng agregado (1)	50	50	75	100
ng encontrado (1)	$89.2 \pm 4.9$	$89.0 \pm 3.7$	$96.1 \pm 1.9$	$168 \pm 12$
Recobro 1, %	108.4	90.8	99.4	92.2
ng agregado (2)	100	100	112.5	200

ng encontrado (2)	144 ± 12	145 ± 2.9	122 ± 11	252 ± 15
Recobro 2, %	108.8	98.0	90.9	89.3
<i>Límites de detección y cuantificación como ng de analito por mL de orina</i>				
LD, ng/ml	1.05	1.51	2.68	3.00
LC, ng/ml	3.48	4.99	8.83	9.92
<i>Límites de detección y cuantificación como fmol por inyección</i>				
LD, fmol	7.15	8.87	11.1	8.90
LC, fmol	23.7	29.3	36.6	29.4

Tabla 9. Concentraciones de poliaminas (ng/mL) encontradas en muestras de orina de personas saludables, pacientes diabéticos sin complicaciones y pacientes diabéticos con severas complicaciones (seis sujetos por grupo, n=3).

Grupo		Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
Sujetos saludables	media ± SD	37.9 ± 9.1	44.9 ± 13.3	18.7 ± 6.9	82.6 ± 6.3
	Intervalo	27.3 - 50.1	21.5 - 61.9	9.1 - 27.2	72.1 - 90.1
Pacientes diabéticos	media ± SD	141 ± 72.7	70.3 ± 32.1	27.1 ± 13.0	80.1 ± 11.2
	Intervalo	93.1 - 225	43.9 - 106	15.1 - 41.2	75.1 - 98.3
Pacientes con complicaciones	media ± SD	242 ± 138	191 ± 91	98.5 ± 118	115 ± 63.7
	Intervalo	146 - 401	106 - 287	19.5 - 234	75.3 - 188

#### 4.2.6 Conclusiones.

En este trabajo, se utilizó FNBT como agente derivatizante para la determinación de cuatro PA's en muestras biológicas por medio de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-ITMS/MS). La formación de las PA's y del IS totalmente derivatizadas fue demostrado por medio de espectrometría de masas de alta

resolución (ESI-QTOFMS). El pretratamiento consistió en la adición de un estándar interno seguido de una extracción con diclorometano, derivatización y extracción de las NBT-poliaminas con hexano, lo que permitió eliminar la mayor parte de la matriz. Una vez establecidas las condiciones de la cromatografía y de la detección por medio de espectrometría de masas en tándem (MRM), se evaluó la relación entre la señal de supresión/mejora para los extractos de planta y orina humana donde se obtuvieron resultados en el intervalo de 82.3-115.4%; los porcentajes de recobro obtenidos por medio de la adición de estándares fueron en el intervalo 83.7-114.4%.

Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el nivel de fmol por inyección y fueron similares a esos reportados recientemente con el uso de instrumentación más poderosa respecto a la utilizada en este trabajo. Se demostró que el procedimiento propuesto es capaz de determinar las cuatro PA's a niveles fisiológicos y también se mostró su capacidad de detectar diferencias en la concentración de estos analitos en diferentes niveles de estrés abiótico o entre diferentes condiciones clínicas comparado con respectivos grupos controles.

Los resultados obtenidos respecto a *L. sativum* son consistentes con el conocimiento actual, por otro lado, los datos obtenidos a partir del análisis de orina señalan el posible rol de las poliaminas libres como biomarcadores de diabetes.

#### 4.3 Cambio en el perfil metabólico en *Helianthus annuus* bajo exposición a Cr(VI) estudiado por medio de capHPLC-ESI-QTOF-MS/MS

##### 4.3.1 Introducción.

Hay muchos tipos de elementos que pueden ser causantes de estrés abiótico en plantas, entre los más estudiados se encuentran los metales/metaloides como el cadmio, cobre o arsénico[93, 94]; sin embargo, estudios sobre el estrés causado por cromo (Cr(VI)) con un enfoque metabólico han sido escasos. Específicamente, se ha evaluado la respuesta en raíces de arroz usando resonancia magnética nuclear (NMR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas[95]. En otro trabajo, se utilizó cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-HRMS) para evaluar el perfil metabólico en *Nicotiana langsdorffii* transgénica y silvestre bajo exposición a Cr(VI)[96].

Por otra parte, la absorción, distribución, especiación y efectos tóxicos del Cr(VI) en diferentes familias de plantas han sido bien documentados y para *Helianthus annuus*, su utilidad para propósitos de remediación ha sido demostrada[97-99]. Bajo este marco, se hace relevante evaluar el impacto del Cr(VI) en el perfil metabolómico de esta planta en específico.

De las dos principales plataformas analíticas en uso, la espectrometría de masas ha mostrado tener mayor sensibilidad y un mejor rendimiento en la identificación de múltiples metabolitos en matrices biológicas con respecto a la NMR[100]. Cuando la cromatografía de líquidos es acoplada espectrometría de masas de alta resolución, se adquiere una gran cantidad de información sobre compuestos iónicos o térmicamente inestables sin necesidad de pretratamientos complejos o derivatización pre-columna; no obstante, estos datos son muy complejos y, debido a la gran variedad de condiciones de ionización/cromatográficas disponibles, la identificación de metabolitos por medio de bases de datos se hace difícil a diferencia de GC-MS[101].

Usualmente, para el análisis de perfiles metabólicos se utiliza un cromatógrafo de líquidos que suele acoplarse mediante ESI a espectrómetros de masas de alta resolución como tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF), orbitrap o ciclotrón con transformada de Fourier. Por otra parte, si se busca cuantificar metabolitos específicos, el tripe cuadrupolo (QqQ) resulta ser de los instrumentos más señalados[102]. Una vez obtenidos los datos provenientes de LC-MS, estos requieren ser procesados. En un flujo de trabajo típico, el ruido es filtrado y corregido, los picos son detectados, deconvolucionados, alineados y normalizados para después obtener una lista de características moleculares. Estas características moleculares frecuentemente son evaluadas estadísticamente para detectar diferencias entre los perfiles de diferentes grupos o muestras[103]. En análisis metabolómicos no dirigidos (“untargeted”), la lista de las características moleculares suele ser el inicio de la identificación de metabolitos. Si el propósito es comparar dos condiciones biológicas (exposición a Cr(VI) contra no exposición en plantas), las herramientas estadísticas pueden ser usadas para detectar cambios en las señales bajo ciertos criterios estadísticos lo que permite pre-seleccionar compuestos de interés y así reducir en número de compuestos a identificar[104]. El procesamiento y análisis estadístico de datos puede ser

llevado a cabo por los programas que proveen las marcas de los equipos utilizados; tales como el caso de DataAnalysis y ProfileAnalysis de Bruker Daltonics. Sin embargo, están disponibles gratuitamente muchas plataformas computacionales para el análisis de datos como lo es XCMS, el cual es utilizado en este trabajo[105, 106].

El análisis de los extractos de plantas es de especial interés cuando se trata de evaluar el impacto del Cr(VI) sobre el metabolismo de estas. Sin embargo, tomando en cuenta que estos extractos son muy complejos debido a la gran diversidad de metabolitos presentes, en un enfoque de metabolómica no dirigida la identificación de los compuestos de interés se presenta extremadamente difícil. La principal razón de esta situación obedece a una gran variedad de metabolitos con similar masa molecular y estructuras; aun contando con que la exactitud de masas que podemos obtener con la instrumentación adecuada sea  $< 1$  ppm esto no parece ser suficiente para identificar los metabolitos de interés[107]. Otra dificultad radica en la baja cantidad de metabolitos presentes en las base de datos; de acuerdo a una reciente estimación, 50899 estructuras contenidas en la base de datos de metabolitos de plantas KNApSAcK corresponde solo al 5% aproximadamente de todos los metabolitos conocidos[108]. Finalmente, los metabolitos están usualmente presentes en un amplio intervalo de concentraciones lo que dificulta el análisis de todos aquellos que se presentan en bajas concentraciones.

Tomando en cuenta los aspectos mencionadas anteriormente, la identificación de metabolitos en un enfoque de metabolómica no dirigida es una tarea muy desafiante. Cuando se trabaja con LC-MS, hay varios parámetros que son necesarios para investigar la identidad de los compuestos de interés, entre ellos: tiempo de retención, formación de aductos durante ionización, masa exacta de iones y su patrón isotópico, así como los espectros de fragmentación. Muchos métodos computacionales han sido desarrollados basados en una o más de las características mencionadas anteriormente. Tomar en cuenta la masa exacta junto con su patrón isotópico es siempre el primer paso, el cual es seguido por la generación de la fórmula molecular, búsqueda de candidatos en base de datos y elucidación de la estructura molecular por medio de espectros de MS/MS. En este trabajo se utilizaron herramientas como SIRIUS (<https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius2/>), la cual utiliza patrones isotópicos obtenidos por HRMS y espectros de MS/MS para construir arboles de fragmentación; la

elucidación del metabolito consiste en la comparación estadística del espectro experimental con aquel construido in silico[109]. Otra herramienta utilizada fue MS-Finder (<http://prime.psc.riken.jp/>) el cual llega a la posible fórmula molecular a partir del espectro de masas y de MS/MS aplicando una serie de reglas heurísticas y una tabla de posibles pérdidas neutras[108].

#### 4.3.2 Objetivos particulares.

- Encontrar diferencias en el perfil metabolómico del girasol bajo exposición a Cr(VI) respecto a la planta no expuesta por medio de herramientas estadísticas.
- Preseleccionar para su identificación los metabolitos involucrados en la respuesta del girasol al Cr(VI).
- Utilizar SIRIUS y MS-Finder para la obtención de fórmulas moleculares y asignación de probables estructuras.

#### 4.3.3 Condiciones experimentales.

Las semillas de *Helianthus annuus* fueron esterilizadas superficialmente con 3% m/v de hipoclorito de sodio durante 20 minutos, lavadas con agua desionizada, y después germinadas en placas Petri usando filtros Whatman humedecidos con solución Hoagland. Después de 5 días, los germinados fueron removidos de las placas y divididos en cuatro grupos: dos de ellos fueron crecidos hidropónicamente en solución Hoagland modificado con Cr(VI) (25 mg/L) y los otros dos fueron crecidos como control, sin adición de Cr(VI). Las plantas fueron cosechadas después de diez días, y las raíces fueron separadas de la parte aérea. De esta manera se obtuvieron ocho grupos: raíces expuestas y control, parte aérea expuesta y control (dos replicas biológicas por cada uno). La biomasa fue homogenizada inmediatamente agregando nitrógeno líquido para después ser liofilizadas.

Para la determinación de Cr por medio de ICP-MS, a 50 mg de muestra se le agregó 800  $\mu$ L de agua desionizada, 200  $\mu$ L de una solución de estándar interno (2 mg/L de In, Y, Bi, y Rh; 5mg/L de Sc; y 10mg/L de Li) y 1 mL de ácido nítrico concentrado. En la digestión asistida por microondas, las muestras fueron calentadas utilizando el siguiente programa: 180 °C, tiempo de rampa: 3 min, presión: 300 psi, poder: 300 y agitación: media (sistema de digestión asistido por microondas Discover SP-D; CEM). Las muestras fueron centrifugadas (13 000 g, 10 min), y alícuotas de 200  $\mu$ L fueron diluidas 20 veces con agua desionizada e

introducidas al sistema ICP-MS. El instrumento fue un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce; Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y una cámara de nebulización Peltier (2 °C). Se monitorearon los isotopos  $^{52}\text{Cr}$  y  $^{53}\text{Cr}$  y sus señales fueron normalizados por la de  $^{89}\text{Y}$ . En la calibración se utilizó un estándar comercial de Agilent a concentraciones de 0, 0.4, 1.0, 5.0, 10, 50 y 100  $\mu\text{g/L}$  de cromo y un estándar interno de Y de 10  $\mu\text{g/L}$ . El límite de detección del instrumento para el Cr fue de 23 ng/L; el límite de detección del método fue de 19 ng/g y fue evaluado usando un control de raíz diluido 20 veces. Para comprobar la exactitud, se analizó un material de referencia que consistía en hojas de cítricos (NIST 1572); la concentración de Cr encontrada en el análisis del material de referencia, hecho por triplicado, fue de  $0.77\pm \mu\text{g/g}$  en buena concordancia con el valor certificado de  $0.8\pm \mu\text{g/g}$ .

Para la extracción de metabolitos, a 25 mg de biomasa proveniente de la raíz se le adicionó 1 mL de metanol al 80% v/v y se sonicó durante 15 minutos para después diluir hasta un 12% v/v de metanol. Las muestras fueron centrifugadas (13 000 g, 10 min) antes de la inyección a la columna.

El espectrómetro de masas fue modelo maXis impact ESI-QTOF-MS equipado con DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics), el cual fue acoplado a un cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 RLSCnano operado por medio de Hystar 3.2 (Thermo Scientific Dionex). Se utilizaron una trampa capilar (5 x 0.3 mm, C18, 5  $\mu\text{m}$ ) de Agilent y una columna capilar de fase inversa Halo C18 (150 x 0.3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ); las capilares de conexión fueron nanoViper (i.d. 50  $\mu\text{m}$ ).

Se utilizaron dos fases móviles donde (A) es 0.1% v/v de ácido fórmico y (B) es 0.1% v/v de ácido fórmico en acetonitrilo. El auto muestreador del cromatógrafo se mantuvo a 4 °C donde 5  $\mu\text{L}$  del extracto de planta fue cargado en la trampa capilar con un flujo de 15  $\mu\text{L/min}$ , usando 10% de B. Después de dos minutos, el flujo fue cambiado hacia la columna capilar, la cual se encontraba a 40°C, y la separación se llevó a cabo a un flujo de 3  $\mu\text{L/min}$  usando el siguiente programa de elución: de 0 a 54 min se aplicó un gradiente lineal de 10% a 95% de B; 54-56 min se mantuvo el porcentaje de 95% de B; 56-57 min regreso a 10% de B; finalmente, se mantuvo 11 minutos con 10% de B con el objetivo de reequilibrar la columna resultando una corrida cromatográfica de 68 minutos. La salida de la columna fue conectada

a una fuente de ionización ESI. Como calibrador de masas, a la fuente ESI se introdujo de manera continua un estándar de metil estearato con una  $m/z$  de 299.2945. La fuente de ionización ESI fue operada en modo positivo con un voltaje de nebulización de 4500 V, end plate offset de 500 V, un flujo de gas de secado de 4 L/min, temperatura de secado 180°C y presión del gas de nebulización de 0.4 bar. Los espectros fueron obtenidos con una velocidad de adquisición de 4 Hz en el intervalo de 50-1250  $m/z$ . Para la lista de precursores seleccionados, las corridas cromatográficas fueron repetidas usando un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$  y en modo MS/MS (energía de colisión de 20 eV).

Los datos crudos capHPLC-ESI-QTOF-MS para cada muestra fueron procesados usando el programa de Bruker DataAnalysis 4.1 con el cual se hizo una recalibración de las masas usando la señal del metil estearato, una sustracción del fondo y búsqueda de las características moleculares. Para encontrar las características moleculares, en los parámetros se fijó un límite de señal/ruido de 3, un mínimo de 20 espectros por compuesto, un coeficiente de correlación de 0.7, y un suavizado de 10. La lista de características moleculares generada fue abierta en ProfileAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics); los atributos de grupos fueron definidos como 1 (expuesto a Cr(VI)) y 0 (sin exposición a Cr(VI)). Los “rectangle bucketing” fueron construidos utilizando los siguientes parámetros: anchura del tiempo de retención y  $m/z$ , 60 s y 1 Da, respectivamente; tomando los datos en tiempo de separación de los 5.5 a los 44.5 minutos. Se utilizó la opción de suma de buckets para la normalización. Para comparación estadística de dos grupos de plantas, se utilizó una prueba t, y una razón de cambio de señal de 5 como límite inferior y un valor de  $p < 0.01$ , se consideraron solamente las señales de intensidad mayor de  $5 \times 10^4$  cps. De esta manera se obtuvo la lista de precursores.

Estos mismos datos LC-MS crudos fueron cargados a XCMS donde se seleccionó pairwise como el formato de análisis estadístico a realizar. En la selección de instrumento se optó por UPLC/Bruker QTOF POS, lo cual automáticamente activó el algoritmo de centWave para encontrar las características moleculares. Los parámetros usados en centWave fueron: una tolerancia de 10 ppm entre medidas sucesivas, una anchura de pico de 5-20 s, relación señal/ruido de 6, y el algoritmo orbiswarp para el alineamiento de los tiempos de retención (anchura de  $m/z$  de 0.9s, fracción mínima de muestras de 0.5 para validación del grupo). Para visualizar las diferencias entre los grupos, se obtuvo una gráfica de nubes aplicando los

mismos criterios que en ProfileAnalysis. Una prueba de Welch fue aplicada ( $p < 0.01$ ) para obtener la lista de precursores.

Las dos listas de precursores fueron manualmente revisadas dejando solo esos iones que coincidieron en ambos enfoques.

Los datos fueron readquiridos en modo LC-MS/MS de acuerdo a las listas de precursores generadas para ser analizadas por medio de las herramientas SIRIUS 3.2 – CSI: FingerID y MS-Finder.

#### 4.3.4 Resultados y discusión.

En experimentos preliminares, a la solución de crecimiento hidropónico Hoagland se adicionaron concentraciones de 1, 5, 10, 15, 25, 30, 35, 40 y 50 mgCr(VI)/L. La inhibición del crecimiento fue dependiente de la concentración, siendo la de 35 mgCr(VI)/L la concentración a partir de la cual se observó una inhibición total del crecimiento.

Para el estudio metabólico, se aplicó la dosis de 25 mgCr(VI)/L. Después de 10 días de exposición, las raíces fueron 60% más cortas en el grupo expuesto comparado con el grupo control; sin embargo, los niveles de clorofila no fueron afectados. La media para el valor de SPAD para los controles fue de  $35.10 \pm 0.24$  y para las plantas expuestas fue de  $32.01 \pm 0.57$  (chlorophyll meter SPAD-502, Minolta Co. LTD.).

El cromo total encontrado en raíces fue de  $4.86 \pm 0.34$  mg/g bajo exposición a Cr(VI) y  $1.33 \pm 0.08$   $\mu\text{g/g}$  para el grupo control (media con sus respectivas desviaciones estándar obtenidas para 4 réplicas). En la parte aérea, las concentraciones de Cr fueron substancialmente más bajas:  $74.5 \pm 1.2$   $\mu\text{g/g}$  y  $1.09 \pm 0.03$   $\mu\text{g/g}$  para los grupos expuestos y control, respectivamente. Distribuciones similares han sido reportadas anteriormente[110]. Debido a que la raíz fue la parte que más cromo retuvo y su crecimiento fue marcadamente inhibido comparándolo con la parte aérea, se determinó analizar los extractos de raíz solamente.

En la figura 11, se presenta un cromatograma de pico base de extractos de raíz expuesta y no expuesta a Cr(VI) donde se observan claras diferencias en los perfiles de elución.

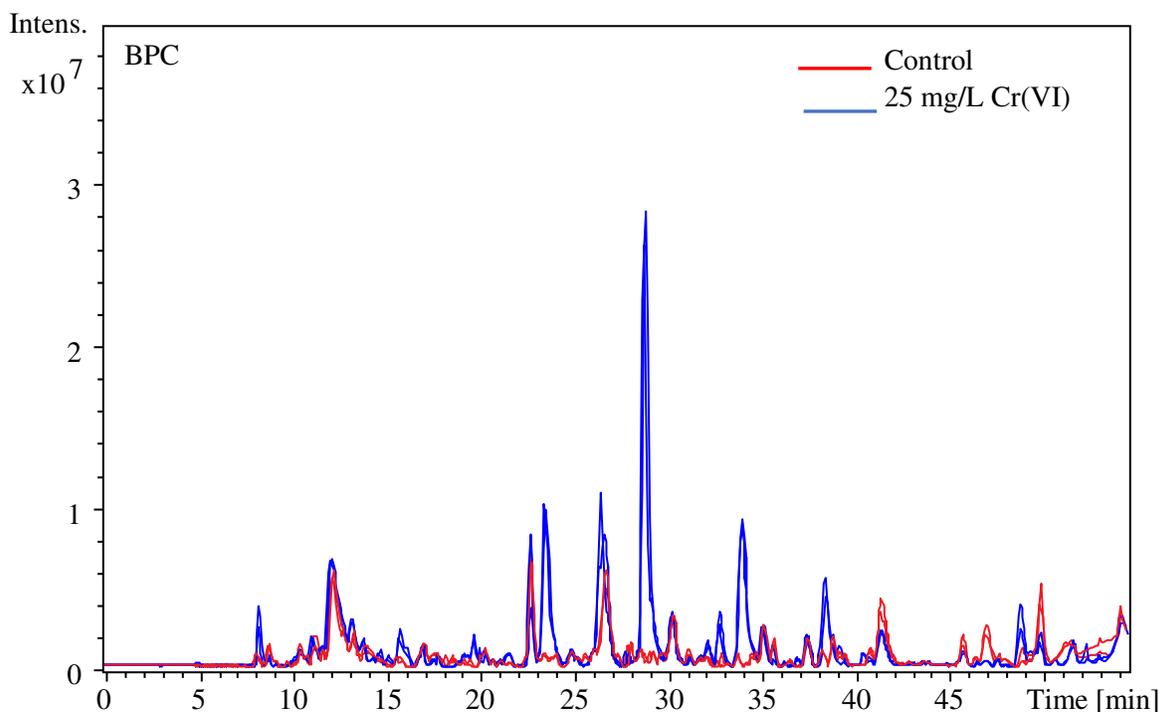


Figura 11. Cromatogramas de pico base obtenidos para los extractos de raíz expuestos a Cr(VI) (azul) y para el control, plantas no expuestas (rojo). Se muestran dos replicas técnicas para cada una de las dos muestras.

En la figura 12 se presenta una gráfica de nubes y otra de volcán, estas graficas fueron obtenidas de la plataforma XCMS y el programa ProfileAnalysis respectivamente. Durante la generación de las gráficas, se tomaron en cuenta los mismos valores de  $p$  y de la razón de cambio y el umbral de intensidad para detectar picos; sin embargo, en el programa de ProfileAnalysis (grafica de volcán) no se incluyó el parámetro de discriminación por medio de la intensidad de los iones, es por eso la gran cantidad de características moleculares que aparecen en esta gráfica en contraste con la gráfica de nubes (Figura 12). En la gráfica de nubes (Figura 12(a)), las características moleculares que presentan mayor intensidad y están sobre-regulados en los extractos de raíz bajo estrés son marcados con verde; mayor intensidad del ion está marcada por la mayor intensidad del color. Por su parte, aquellos iones que están sub regulados aparecen en rojo con el mismo criterio de intensidad de color. En ambos colores, la circunferencia de los círculos tiene que ver con el valor de  $p$ ; entre más bajo es el valor de  $p$  mayor es el diámetro del círculo. En la gráfica de volcán (Figura 12 (b)), las

características moleculares sobre-reguladas están indicadas como círculos de color amarillo y con un valor negativo de  $\log_2$  fold change.

Una vez comparados los resultados obtenidos utilizando ProfileAnalysis y XCMS y eliminando todas aquellas señales con baja intensidad ( $<5 \times 10^4$  cps) se obtuvieron siete características moleculares de relativamente alta intensidad, que presentaron una razón de cambio respecto al control con valores desde 6 hasta 75 con una  $p < 0.01$ . De 23360 características moleculares inicialmente detectadas,

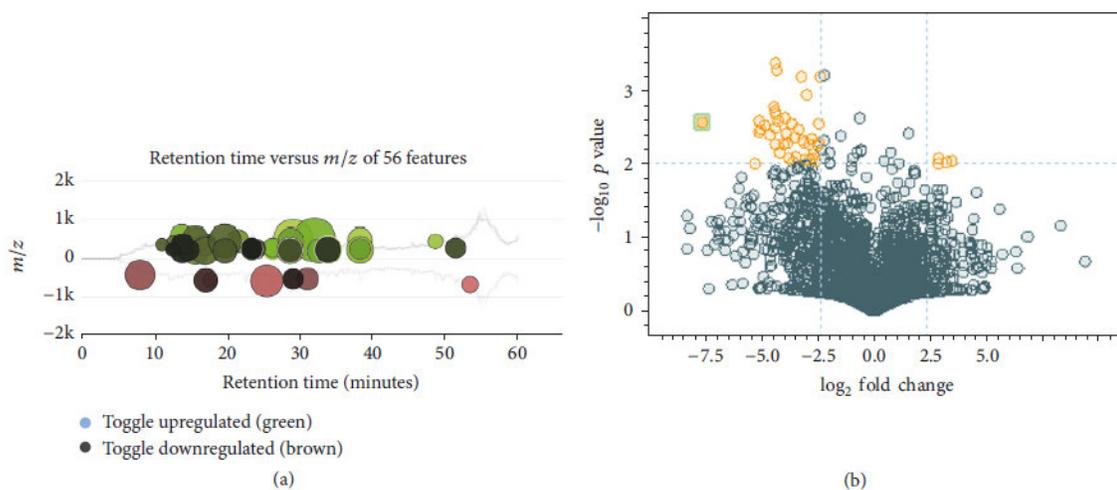


Figura 12. Análisis de los datos obtenidos en LC-MS para generación de la lista de precursores: (a) gráfica de nubes generada en XCMS con los siguientes parámetros: Intensidad  $>5 \times 10^4$ ; relación de cambio  $\geq 5$ ;  $p \leq 0.01$ . (b) Gráfica de volcán obtenido con ProfileAnalysis con los siguientes parámetros: razón de cambio  $\geq 5$ ;  $p \leq 0.01$ .

1930 fueron procesadas ( $p < 0.05$ ) y estos se redujeron a 7 producto de la prueba estadística  $t$  así como de la discriminación utilizando la razón de cambio y la intensidad. En la Tabla 10 se presentan la lista de precursores a la que se les asigna un número (ID), tiempo de retención, valor de  $m/z$  y valor de  $p$  para cada una de ellas.

Tabla 10. Lista de precursores y formulas moleculares aceptadas.

m/z	Composición	RT	fold	pvalue
217.0852	C13H12O3	29.1	33	0.04
231.1360	C15H18O2	38.6	34	0.12
233.0795	C13H12O4	34.2	28	0.01
235.0948	C13H14O4	12.9	6	0.01
247.1315	C15H18O3	23.7	19	0.02
367.1736	C19H26O7	17.3	17	0.06
453.1739	C22H28O10	20	75	0.04

Los datos obtenidos para los siete precursores (MS y MS/MS) fueron procesados en SIRIUS. Para cada uno de ellos, el algoritmo computó y puntuó todas las posibles fórmulas moleculares. Como ejemplo, la Figura 13 muestra una impresión de pantalla con los resultados obtenidos para el ion precursor m/z 231.1367. Se puede observar que el árbol de fragmentación para la formula C15H28O2 fue compuesto por 15 fragmentos, once de ellos con puntuaciones dentro del intervalo de 3.01 a 5.92 (de medio a alto), dos con puntuaciones de 2.29 y 2.63 (medio) y solo dos con puntuación negativa. La fórmula seleccionada fue la del mayor puntaje (51.67). Para cada formula que se predijo las posibles estructuras moleculares, estas fueron buscadas en CSI:FingerID; las tres primeras estructuras predichas para m/z 231.1367 corresponden a metabolitos secundarios que pueden ser catalogadas como sesquiterpeno lactonas.

En el segundo enfoque, para producir las fórmulas y posibles estructuras de los siete iones precursores se utilizó MS-Finder. Tomando el mismo ion m/z 231.1367 y la formula C15H28O2 como ejemplo, los resultados de MS-Finder son presentados en la Figura 14. El patrón isotópico experimental y el espectro de MS/MS fueron comparados con aquellas generadas *in silico*; en este caso, el 70% de los valores asignados a los fragmentos experimentales fueron  $\geq 0.5$ . Usando las bases de datos antes mencionadas, los códigos InChIKey de las estructuras son mostradas en la impresión de pantalla; para 231.1367 m/z, las estructuras sugeridas fueron sesquiterpenos.

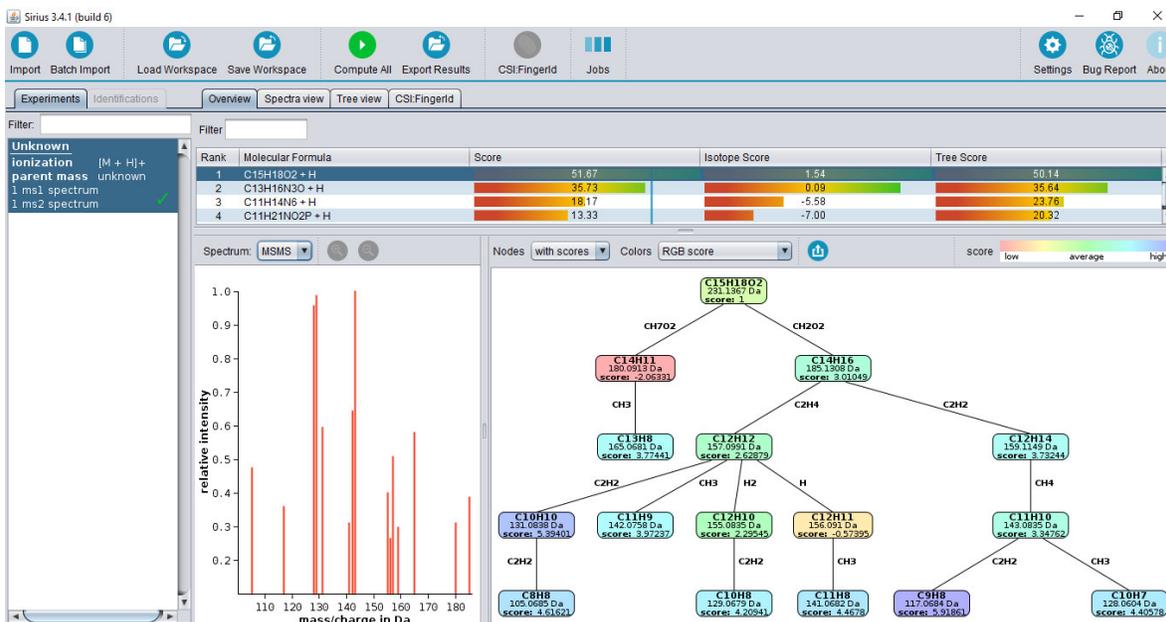


Figura 13. Impresión de la pantalla SIRIUS que muestra los resultados obtenidos para el precursor 231.1367 m/z; se muestra el espectro MS/MS experimental, árbol de fragmentación, y las primeras 4 formulas con su respectivo puntaje.

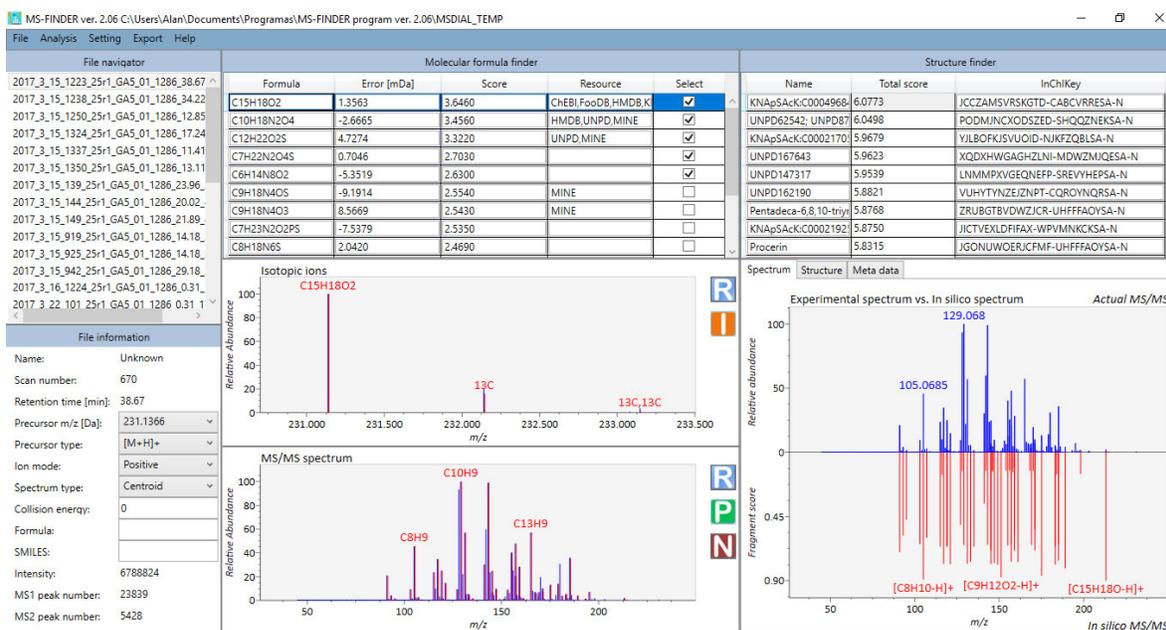


Figura 14. Impresión de la pantalla de MS-Finder donde se muestran los resultados para el ion precursor m/z 231.1367. El patrón isotópico y los espectros de MS/MS experimentales (azul) y teórico (rojo) se muestran juntos. La lista de posibles fórmulas con su error de masa y puntaje son presentadas y para la formula seleccionada; también se presentan las posibles estructuras sugeridas por búsqueda en las bases de datos.

Los datos de MS/MS obtenidos para otros seis precursores fueron analizados de la misma manera como se describe antes. Las tres formulas moleculares mejor puntuadas por los dos programas fueron consideradas y aquella que aparece en ambas listas fue tomada como la más confiable. En la figura 15, estas fórmulas son reportadas junto con sus puntuaciones y con negrita quedó marcada la fórmula finalmente seleccionada. Adicionalmente, en la misma figura 15 se muestran los cromatogramas del ion extraído en la región donde se eluye el compuesto para dos replicas biológicas de los grupos expuesto y no expuesto a Cr(VI); el efecto provocado por estrés abiótico de Cr(VI) es evidente (los valores de la razón de cambio son mostrados en la tabla 11).

La búsqueda de las estructuras correspondientes a las fórmulas en las bases de datos fue ejecutada por CSI:FingerID en el caso de SIRIUS y directamente en MS-Finder. Las primeras tres estructuras mejor puntuadas con las dos herramientas son presentadas en la Tabla 11 con sus códigos InChIKey.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, hay muy pocos estudios disponibles sobre el efecto de Cr(VI) en el metaboloma de las plantas y menos aún sobre *Helianthus annuus*. Aunque la evidencia experimental obtenida en este trabajo no es suficiente para identificar con certeza las especies químicas afectadas por Cr(VI), las posibles estructuras presentadas en la tabla 11 señalan a la activación del metabolismo secundario bajo las condiciones de exposición aplicadas. Esta evidencia es respaldada por estudios sobre el impacto de metales/metaloideos en plantas[111]. Debido a la naturaleza oxidante del Cr(VI) hay un aumento de la producción de ROS y como consecuencia del estrés oxidativo terminando por estimular las rutas de señalización que desemboca en un incremento en la biosíntesis de metabolitos secundarios[112].

La búsqueda en las bases de datos para la formula molecular C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> arrojó derivados de isocumarinas (estructuras 1-6) que son sintetizadas en la ruta de los fenilpropanoides. El aumento de la concentración de estos compuestos ha sido observado en girasol bajo estrés abiótico inducido por Cu(II) y sucrosa[113]. Las isocumarinas son clasificadas como fitoalexinas y presentan un amplio intervalo de actividades farmacológicas dependientes de la estructura. A este respecto, el rol de los grupos hidroxilo y cadenas laterales alquilo han

sido resaltados; como un ejemplo, las 3-butylisocumarinas (estructuras 2 y 6) fueron estudiadas como agentes antifúngicos en otros estudios[114, 115]. Las estructuras 2 y 6 fueron encontradas en plantas de la familia Asteraceae (Base de datos de relaciones metabólicas KNApSAcK) y la estructura 4 se encontró en la base de datos de la universidad de Pekin (UNPD) de productos naturales. Por su parte, las estructuras 1, 3 y 5 fueron encontrados en PubChem mientras que las estructuras 3 y 4 provienen de la base de datos ZINC.

Los seis candidatos para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub> presentan estructuras de sesquiterpenos (compuestos del 7 al 12; tabla 11); cuatro de ellos (7, 9, 11 y 12) contienen  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona el cual es conocido por conferir actividad biológica relevante para la salud[116, 117]. Este grupo de terpenoides en *Helianthus annuus* han sido asociados con la defensa contra patógenos e insectos, de hecho se ha reportado su presencia en flores y en la parte aérea, al igual que su presencia en la rizosfera[118-120]. Los seis compuestos (7-12) fueron encontrados en la base de datos UNDP y, adicionalmente, los compuestos 11 y 12 fueron también encontrados en plantas de la familia Asteraceae (KNApSAcK).

Otro grupo de compuestos que fueron identificados tentativamente como sesquiterpenos fueron aquellos con fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub> (ión precursor 247.1315 m/z). Cuatro estructuras (25, 27, 29 y 30) fueron identificadas como sesquiterpeno lactonas en UNPD y la estructura 28 en KNApSAcK. El primer candidato en la lista de MS-Finder, ácido fomalénico A (UNDP), tiene un esqueleto de ácido graso acetilénico ampliamente presente en plantas y con actividad insecticida y anti herbívora[121].

Los dos primeros compuestos arrojados por SIRIUS/CSI:MSFinder para la fórmula C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> comparten la estructura de benzofuranos (13, 15, UNPD); algunos cientos de benzofuranos han sido identificados en todas las partes morfológicas de las plantas, principalmente en la familia Asteraceae[122]. El compuesto 14 (UNPD), el primero en la lista de MS-Finder, presentó una estructura derivada de cromona reportada en *Nicotiana tabacum* [123]. Otros compuestos (16, 17) corresponden a isocoumarinas y fueron

encontrados en la base de datos herbal de enfermedades cardiovasculares (CDHD) y UNDP, respectivamente; una estructura de cromanona fue sugerida para el candidato 18 (UNPD).

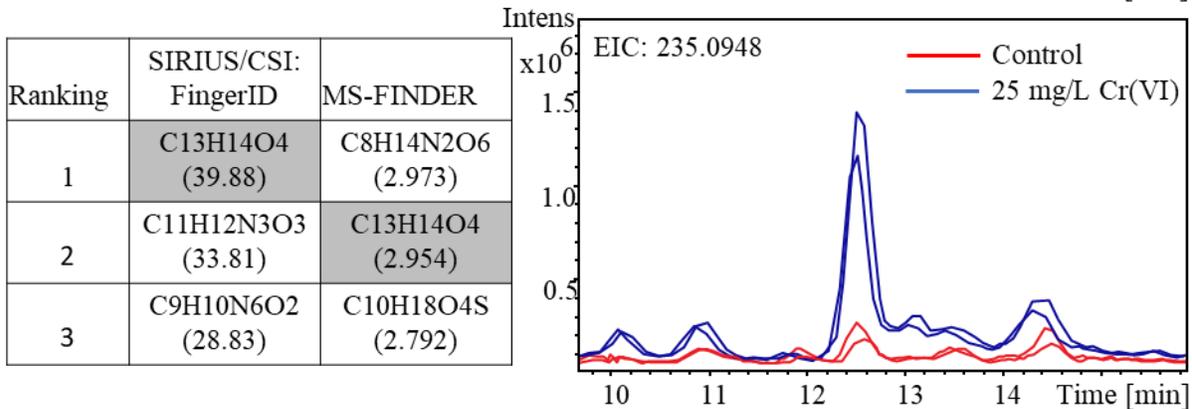
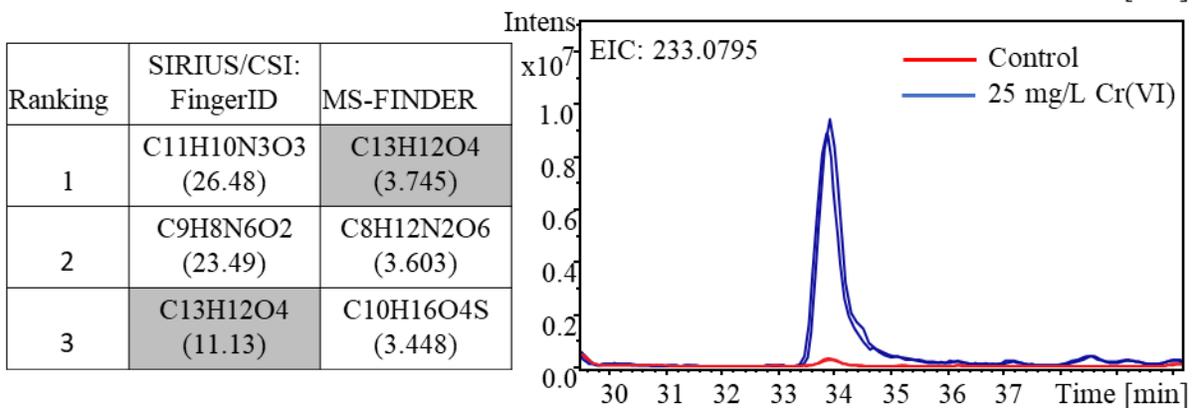
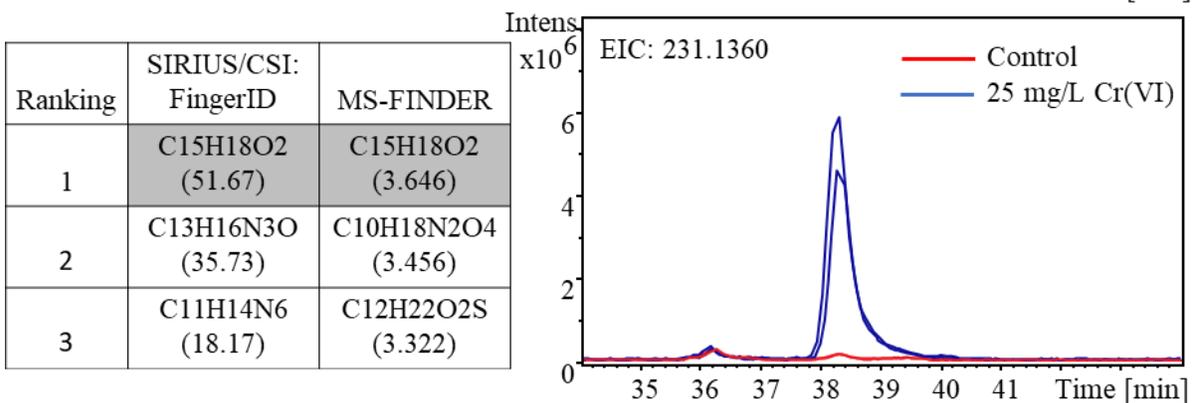
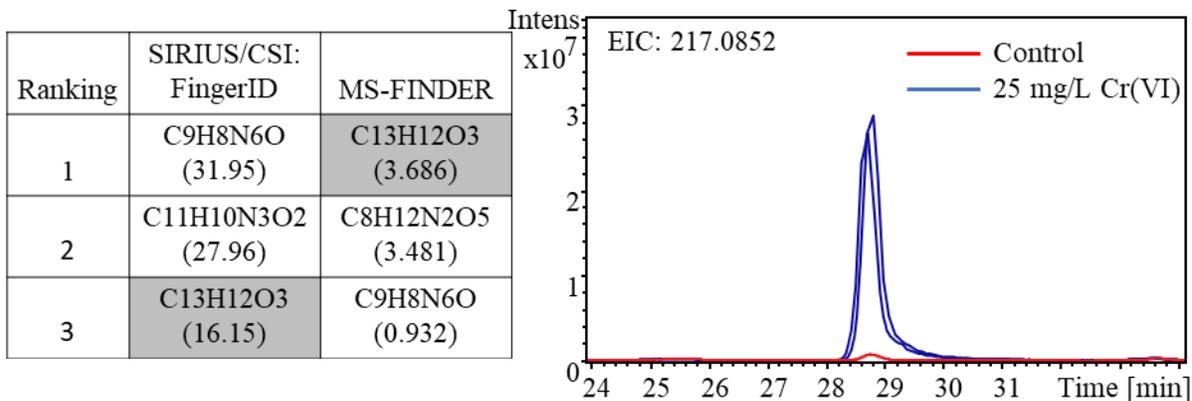
La búsqueda en las bases de datos de la fórmula  $C_{13}H_{14}O_4$  arrojó seis fenilpropanoides con diferentes estructuras, todos ellos incluidos en UNOD. Uno de esos compuestos pertenece a los benzofuranos (19) y otro compuesto puede ser identificado como isocoumarina (20); el compuesto 22 es sugerido como acetato de 1'-acetoxychavicol que ha sido reportado como un potente antioxidante[124].

La fórmula  $C_{19}H_{26}O_7$  presenta el valor  $m/z$  367.1736, mayor que las fórmulas anteriores por lo que la predicción de la estructura puede ser más confiable. Los compuestos 31 y 32 muestran estructuras derivadas de fenil glicósidos (INDP) mientras que los compuestos 33 y 34 corresponden a sesquiterpen lactonas (UNPD) particularmente abundantes y diversas en plantas de la familia Asteraceae[125]. El incremento de la síntesis de sesquiterpeno lactonas ha sido asociado con estrés medioambiental, como parte de una respuesta defensiva contra microorganismos e insectos, estos compuestos actúan como agentes alopáticos y también como protectores frente a factores abióticos[125].

Finalmente, para el precursor con el valor de  $m/z$  más alto (453.1739) y con fórmula molecular  $C_{22}H_{28}O_{10}$ , la estructura numerada 36 pertenece a la familia de los glicósidos iridoides (davisioside, UNPD, KNApSAcK), que son compuestos químicos encontrados en muchas plantas como metabolitos secundarios con actividad biológica contra microbios e insectos[126]. El candidato 38 es un derivado de cumarinas (UNPD) identificado como tschimganic ester A en *Prangos tschimganica* con actividad anti-VIA demostrada[127].

En resumen, considerando los siete iones precursores y 42 posibles compuestos, diez estructuras corresponden a isocumarinas (26%) y 11 fueron sesquiterpenos (29%). Esos grupos de metabolitos secundarios han sido reportados en la familia Asteraceae y algunas en *Helianthus annuus* aunque no en el contexto de estrés abiótico inducido por Cr(VI). En términos de la relevancia del potencial biológico, los datos obtenidos en este estudio son pioneros y señalan hacia futuros estudios que se concentren específicamente sobre la

extracción e identificación de isocoumarinas y sesquiterpenos, los cuales aumentaron su concentración en presencia de Cr(VI). Los resultados obtenidos podrían ayudar a entender los mecanismos involucrados en las respuestas defensivas de las plantas. Mas importante, la activación de rutas de fenilpropanoides observadas en las raíces de girasol bajo estrés sugiere el aumento de síntesis de lignina para reforzar la pared celular, tal como fue reportado en otras plantas expuestas a estrés abiótico y biótico[128, 129]. Por otro lado, como un agente prooxidante, el Cr(VI) promueve la generación de especies reactivas de oxígeno activando cascadas de señalización las cuales involucran a la hormona jasmonato, implicada en la regulación de varios metabolitos secundarios incluidos los terpenos[130].



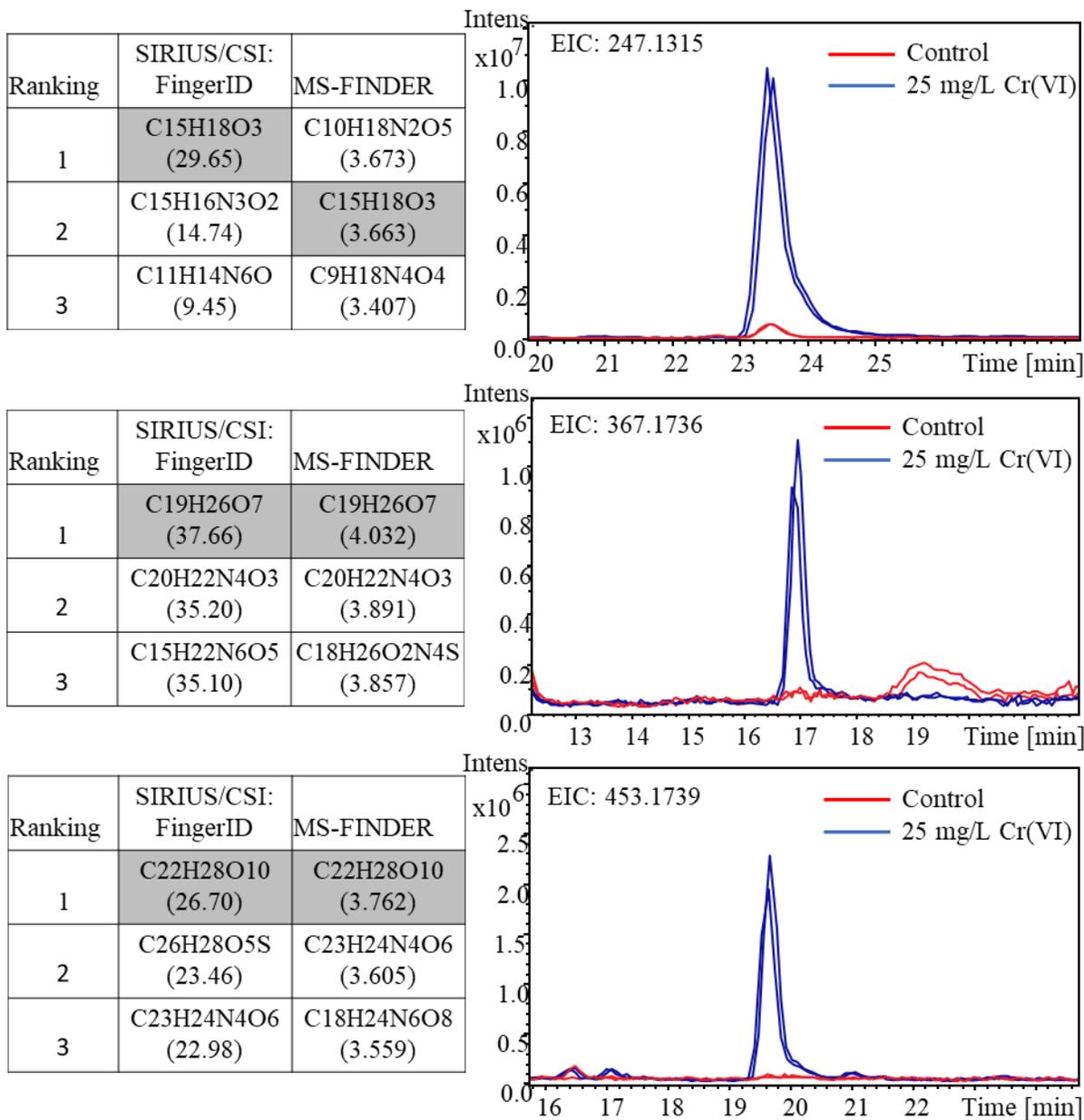
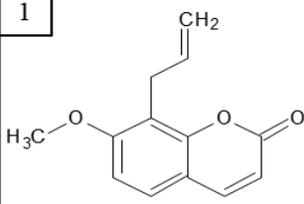
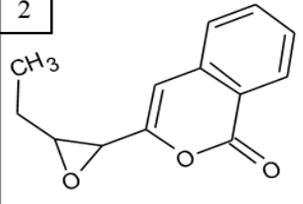
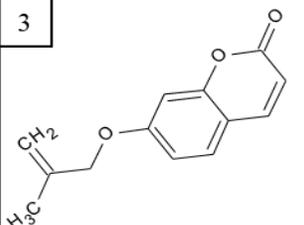
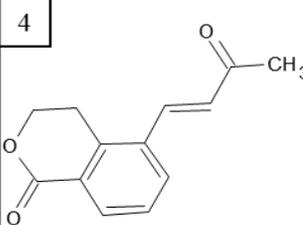
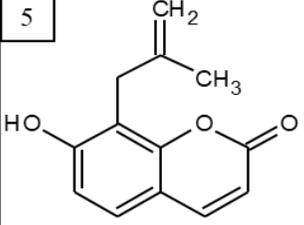
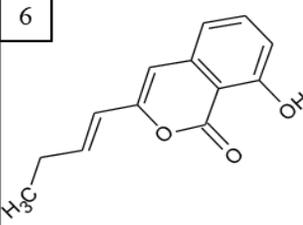
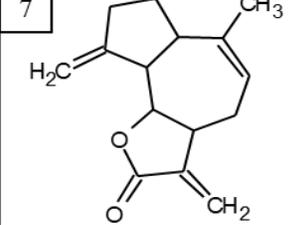
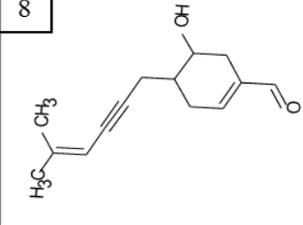
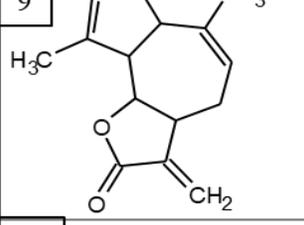
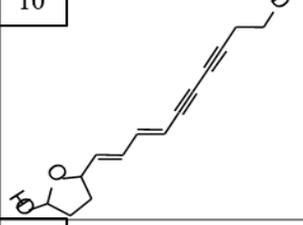
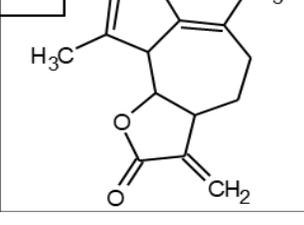
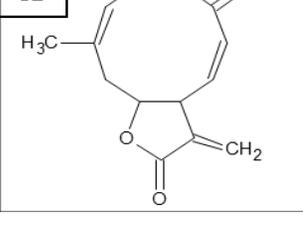
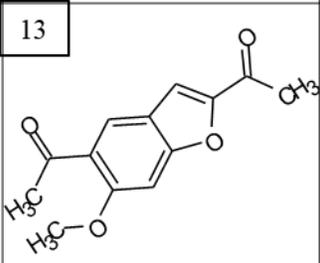
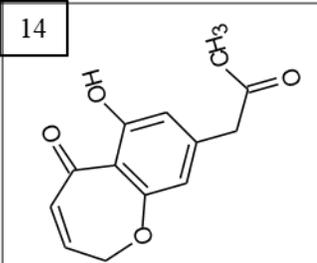
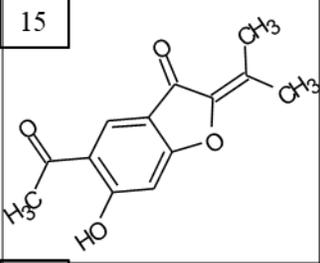
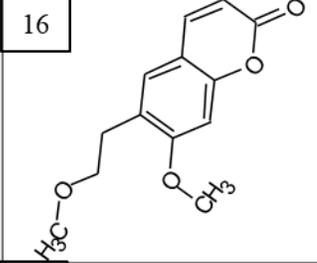
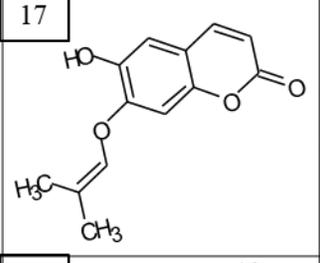
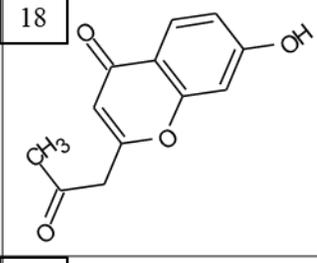
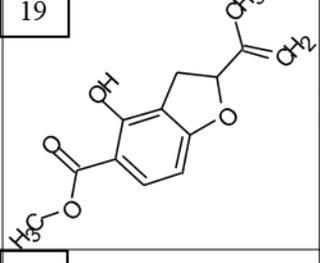
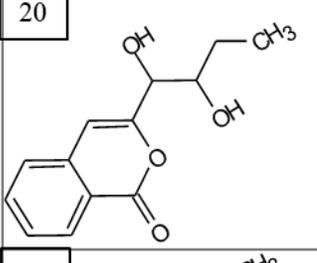
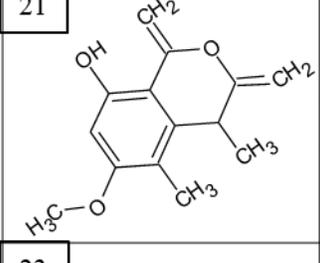
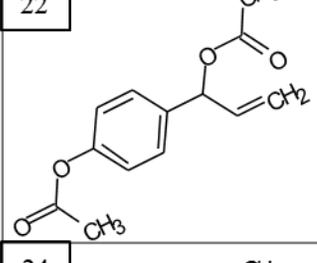
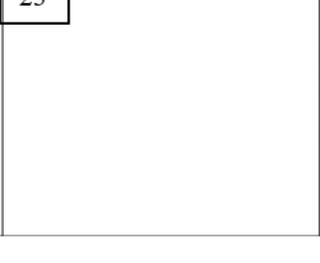
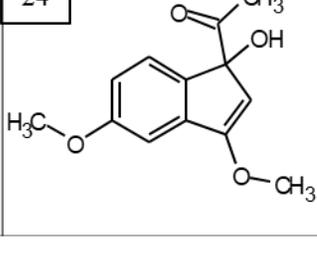
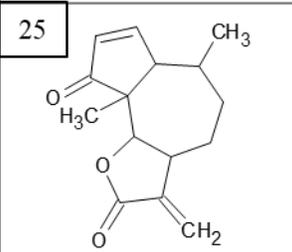
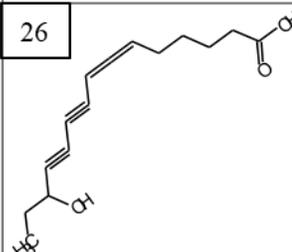
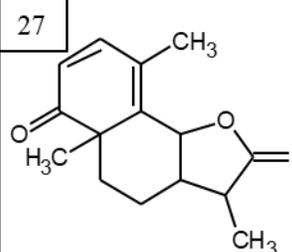
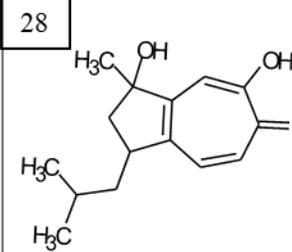
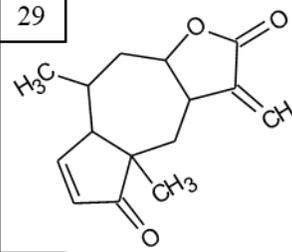
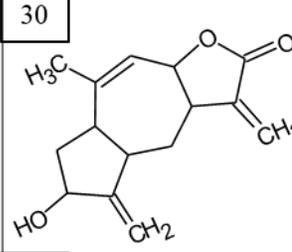
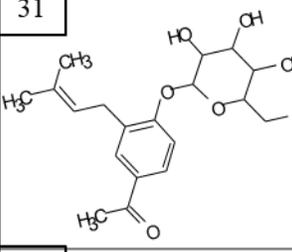
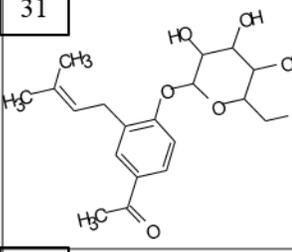
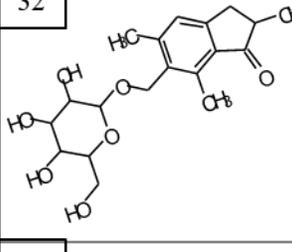
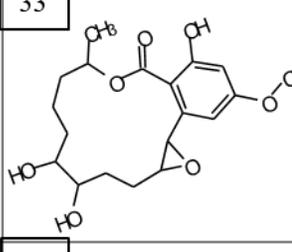
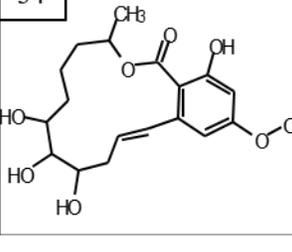
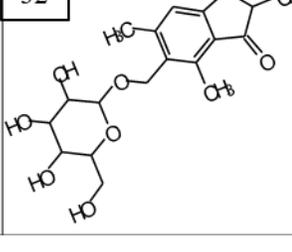


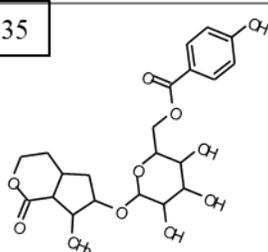
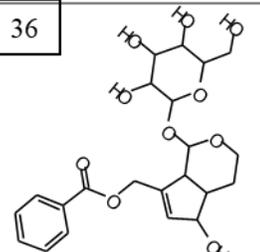
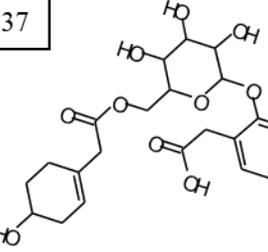
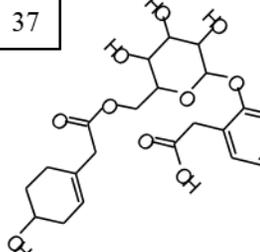
Figure 15. Primeras tres fórmulas sugeridas mediante plataformas SIRIUS y MS-Finder para cada uno de los siete precursores (las puntuaciones son reportadas en paréntesis, los recuadros en gris indican la fórmula escogida para la asignación de estructuras. En el panel derecho se muestran, los cromatogramas de ion extraído adquiridos para las dos replicas biológicas de plantas expuestas y no expuestas a Cr(VI).

Tabla 11. Las tres primeras estructuras obtenidas de las fórmulas de los siete precusores.

m/z	TR	InChIKey	SIRIUS/CSI:FingerID	InChIKey	MS FINDER
217.0852	29.1	GSJJPFOI ZRCDDP	1 	VNEONZF LGNRQJT	2 
		NYYIJXQ ZJGQQOP	3 	RINHRIS DQZMBA U	4 
		AGBDCA VWZDTB KU	5 	KIVJBPP NQCANS	6 
231.1360	38.6	BWRZDL YJNURUH S	7 	JCCZAMS VRSKGT D	8 
		QLXSYIM XIMTCOX	9 	PODMJNC XODSZED	10 
		AVLOGK PJWQCTL P	11 	YJLBOFK JSVUOID	12 

m/z	TR	InChIKey	SIRIUS/CSI:FingerID	InChIKey	MS FINDER
233.0795	34.2	QJIYGTA EIRBFIS	13 	IKOSPDX OTFMSTE	14 
		OHWFUK AVYSSEQ D	15 	UBVZPPS BGZICHG	16 
		ZLEKXX XCHQHH FH	17 	JHELBXA AAYUKC T	18 
235.0948	12.9	UNXITPC UASJXAZ	19 	CRXSSRP VDGICML	20 
		CIGSWLX ZMSXAA E	21 	JAMQIU WGGBSIK Z	22 
		TXCCGIY IORQRRJ	23 	BIUULCN WWFDCP G	24 

m/z	TR	InChIKey	SIRIUS/CSI:FingerID	InChIKey	MS FINDER
247.1315	23.7	IFXGCKR DLITNAU	25 	YZCDHRP WIDTXR F	26 
		CHUWSG RBMLBSS X	27 	RVSUBO UBGSVZR G	28 
		OSSDUQ KWVVZI GP	29 	ZLWTZX NAINCRC G	30 
367.1736	38.6	GVWZZK USNVNW GC	31 	GVWZZK USNVNW GC	31 
		SPOWTC XDLMRZ EG	32 	VBHMOJ MVNMGQ QV	33 
		IFTUAAV SCWBNK T	34 	SPOWTC XDLMRZ EG	32 

m/z	TR	InChIKey	SIRIUS/CSI:FingerID	InChIKey	MS FINDER
453.1739	20.0	DEDRXC YIYLIKT C	35 	JWZUXO UZLUWW EO	36 
		DERMLU RFUNHBP V	37 	DERMLU RFUNHBP V	37 
		JWZUXO UZLUWW EO	38	CRZZEGK PXWDZP M	39

#### 4.3.5 Conclusiones

El estudio del impacto de estrés abiótico impuesto por las formas tóxicas de los metales/metaloideos en plantas es un área desafiante en metabolómica. En este trabajo, nosotros aplicamos cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución para obtener evidencia sobre el impacto que el Cr(VI) podría tener sobre las raíces de *Helianthus annuus*. Más que una extensiva identificación del metaboloma de la planta, el objetivo principal fue el de obtener evidencia sobre el grupo de compuestos que fueron afectados por la presencia de Cr(VI) en cultivos hidropónicos. Para la selección de los iones precursores se aplicaron criterios como la mínima abundancia del ion  $5 \times 10^4$  cps, razón de cambio de abundancia entre grupos expuesto respecto control  $\geq 5$ , y valores de  $p \leq 0.01$ . Además, se utilizaron dos herramientas computacionales (ProfileAnalysis y la plataforma de libre acceso XCMS), seleccionando solamente aquellas características moleculares que fueron encontradas bajo los mismos criterios aplicados en ambas plataformas. Para los siete precursores seleccionados, las fórmulas moleculares fueron asignadas por medio de los

algoritmos de SIRIUS y MS-Finder. Se consideraron como posibles estructuras (o posibles familias a las que pertenecen) los tres candidatos mejor puntuados arrojados por CSI:FingerID y MS-Finder. Los resultados obtenidos señalan al incremento en la síntesis de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: isocumarinas, sesquiterpenos y compuestos fenólicos con lactonas, benzofuranos y glicósidos. La gran mayoría de los candidatos han sido previamente reportados en la familia Asteraceae y algunos de ellos en *Helianthus annuus*, pero el aumento de su síntesis bajo estrés impuesto por Cr(VI) fue demostrado en este trabajo por primera vez. Los datos obtenidos nos sugieren centrar futuros estudios en la identificación de isocumarinas y sesquiterpenos.

#### 4.4. Evaluación del efecto de Cr(VI) sobre la ruta del ácido linoleico en raíz de girasol, mediante herramientas de metabolómica.

##### 4.4.1 Introducción.

En continuación del trabajo presentado en la sección anterior, la siguiente etapa ha sido enfocada a efectos de Cr(VI) en girasol a nivel de metaboloma. Cabe recordar que el cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI B de la tabla periódica. Tiene varios estados de oxidación (desde -2 hasta +6) sin embargo el cromo hexavalente y trivalente (Cr(VI) y Cr(III)) son los dos más comunes y estables en el medio ambiente. Entre ellos, el Cr(VI) presenta mayor toxicidad debido a su movilidad y su capacidad para atravesar la membrana celular. El cromo toma importancia como contaminante debido a que tiende a acumularse en el suelo y en el agua proviniendo de diferentes fuentes antropogénicas como puede ser la industria del cemento, del metal, de la piel, la pintura, pigmentos etc. Como consecuencia de esta contaminación, se produce la transferencia del Cr a los cultivos hasta llegar contenido en los alimentos, a los seres humanos. Por otra parte, la absorción, distribución, especiación y efectos tóxicos del Cr(VI) en diferentes familias de plantas han sido bien documentados y para *Helianthus annuus* se ha demostrado su factibilidad para propósitos de biorremediación. Bajo este marco, se hace relevante evaluar los mecanismos de toxicidad del Cr(VI) en las plantas. Uno de los principales mecanismos de toxicidad del cromo dentro de la célula es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las que se encuentran el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y radicales

hidroxilo (OH) generados ya sea por transferencia directa de electrones que involucran la reducción de Cr(VI) o por la afectación de mecanismos que se encargan de la homeostasis redox[131]. Entre las principales consecuencias de la formación de ROS se encuentran la peroxidación lipídica, daño al DNA, agotamiento de grupos sulfhidrilo libres y alteración de la homeostasis de calcio[132]. En plantas, la peroxidación lipídica causa profundas alteraciones en la estructuras de las membranas y consecuentemente modifica sus actividades de transporte[133]. Aunque anteriormente se han realizado estudios acerca de la peroxidación lipídica provocada por Cr(VI) y otros metales [133, 134], no se ha profundizado en la identificación de los productos de oxidación que es fundamental para entender los mecanismos de toxicidad mediante oxidación de los ácidos grasos.

En este trabajo se analizaron los extractos de raíz de girasol bajo estrés impuesto por Cr(VI) a diferentes concentraciones de cromo (0, 1, 5 y 25 mg/L). El estudio se realizó por capHPLC-ESI-QTOFMS/MS en modo negativo de ionización; después de hacer un análisis estadístico, se encontraron diferencias entre los cuatro grupos que tienen que ver con características moleculares que corresponden a productos de oxidación del ácido linoleico.

#### 4.4.2 Objetivos particulares.

- Cuantificar la concentración de Cr en la raíz como en la parte aérea por medio de ICP-MS.
- Desarrollar un procedimiento capHPLC-ESI-QTOFMS/MS en modo de ionización negativo para encontrar e identificar productos de oxidación del ácido linoleico.

#### 4.4.3 Condiciones experimentales.

Las semillas de *Helianthus annuus* fueron esterilizadas superficialmente con 3% m/v de hipoclorito de sodio durante 20 minutos, lavadas con agua desionizada, y después germinadas en placas Petri usando filtros Whatman humedecidos con solución Hoagland. Después de 5 días, los germinados fueron removidos de las placas y divididos en cuatro grupos (cada uno de ellos con sus respectivas réplicas biológicas): el grupo control fue cultivados hidropónicamente en solución Hoagland, los otros tres grupos fueron cultivados de igual manera en medio Hoaglan pero se les adicionó diferentes concentraciones de Cr(VI) (1, 5 y

25 mg/L). Durante los siguientes siete días las plantas permanecieron en la cámara de crecimiento con 12 horas de luz y doce horas de oscuridad. Las plantas fueron cosechadas después de los siete días, y las raíces fueron separadas de la parte aérea. La biomasa fue homogenizada inmediatamente agregando nitrógeno líquido para después ser liofilizadas.

La determinación de Cr en biomasa se llevó a cabo, utilizando el procedimiento descrito en el capítulo anterior (3.2.3).

Para extraer los metabolitos, se utilizó el mismo procedimiento que en el capítulo anterior debido a que metanol-agua es una mezcla de solventes típicamente empleada para cubrir un amplio rango de metabolitos de plantas [135-137]. En breve, a 25 mg de biomasa proveniente de la raíz se le adicionó 1 mL de metanol al 80% v/v y se sonicó durante 15 minutos para después diluir hasta un porcentaje final de metanol de 12% v/v. Las muestras fueron centrifugadas (13 000 g, 10 min) antes de la inyección a la columna.

Se utilizó la misma configuración de instrumentación analítica que en la sección anterior, con ligeras modificaciones en las condiciones de separación cromatográfica y de detección másica. Específicamente, un espectrómetro de masas maXis impact ESI-QTOF-MS equipado con DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) fue acoplado a un cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 RLSCnano operado por medio de Hystar 3.2 (Thermo Scientific Dionex). Una trampa capilar (5 x 0.3 mm, C18, 5  $\mu$ m) de Agilent, una columna capilar fase reversa Halo C18 (150 x 0.3 mm, 2,7  $\mu$ m) y conexiones capilares nanoViper (i.d. 50  $\mu$ m) fueron usados. Las fases móviles fueron (A) 0.1% v/v de ácido fórmico en agua y (B) 0.1% v/v de ácido fórmico en acetonitrilo. Se inyectó a la trampa capilar 10  $\mu$ L de la muestra la cual estaba a un flujo de 15  $\mu$ L con un 2% de B y 98% de A. Después de 4 minutos el flujo fue cambiado a la columna capilar que estaba a 40 °C. La separación fue llevada a cabo con un flujo de 4  $\mu$ L/min en el que se usó un programa de elución donde del minuto 0 al 16 se elevó B de un 10% hasta un 98% donde se mantuvo hasta el minuto 22. Finalmente, después de cada inyección hubo un tiempo de equilibrio de 10 minutos con 10% de B. El ESI fue operado en modo negativo con un voltaje de capilar de 4500 V, end plate offset 500 V, gas de secado a un flujo de 4 L/min, temperatura de secado de 180 °C y presión de nebulización de 0.4 bar. Los cromatogramas fueron adquiridos a una velocidad de 2.0 Hz para autoMS/MS con un rango de masas de 20-1000 m/z. El límite para autoMS/MS fue de 7000 cts.

Los datos obtenidos fueron enviados a XCMS on-line, tanto los resultados de la parte aérea como los de la parte de la raíz fueron procesados en el formato estadístico multijob donde la prueba realizada fue un ANOVA. Para la detección de características moleculares se utilizó el método centWave empleando una tolerancia de 10 ppm entre medidas consecutivas, anchura de pico de 5-60, límite de señal/ruido de 6, y el método orbiWap para la alineación de los tiempos de retención de los cromatogramas.

Una vez adquiridos los datos de MS/MS se sometieron a un análisis en MS-Finder y SIRIUS, SCI:FinderID para asignar composición elemental y estructuras a las características moleculares.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un desgasificador, un compartimento con termostato para columna y un automuestreador. Este equipo fue acoplado en línea a una trampa de iones (ITMS) por medio de una fuente de ionización ESI (Bruker Daltonics). El sistema HPLC-ESI-ITMS fue controlado por el programa Hystar V3.2 y los datos fueron procesados por el programa DataAnalysis V4.1 SP2 y QuantAnalysis V2.0 SP2. La columna cromatográfica usada fue una Luna C18 (150 x 2 mm, 3  $\mu$ m) con una precolumna (4 x 2 mm), ambos de la marca Phenomenex. El equipo se operó en modo negativo con un voltaje de nebulización de 4500 V con un flujo de secado de 11 L/min con una temperatura de 200 °C y 26 psi. El intervalo de masas fue de 50 a 500 m/z.

#### 4.4.4 Resultados y discusión.

La planta de girasol fue segmentada en la parte de raíz y la parte aérea y ambas fueron analizadas por ICP-MS (figura 16). Los resultados se muestran acordes con aquellos obtenidos anteriormente, en este caso solo un 8% del Cr encontrado en la raíz es encontrado en parte aérea en el caso del grupo sometido a 25 mg/L de Cr(VI). Las concentraciones de Cr encontrado en la raíz con sus desviaciones estándar son  $1.37 \pm 0.36 \mu\text{g Cr/g}$ ,  $0.22 \pm 0.01 \text{ mg Cr/g}$ ,  $0.80 \pm 0.08 \text{ mg Cr/g}$  y  $2.93 \pm 0.20 \text{ mg Cr/g}$  para 0, 1, 5 y 25 mg/L Cr(VI) agregado al medio de cultivo respectivamente. Para la parte aérea las concentraciones de Cr son  $1.23 \pm 0.54 \mu\text{g Cr/g}$ ,  $4.57 \pm 0.13 \mu\text{g Cr/g}$ ,  $41.7 \pm 0.38 \mu\text{g Cr/g}$  y  $237 \pm 19 \mu\text{g Cr/g}$  para 0, 1, 5 y 25 mg/L de Cr(VI).

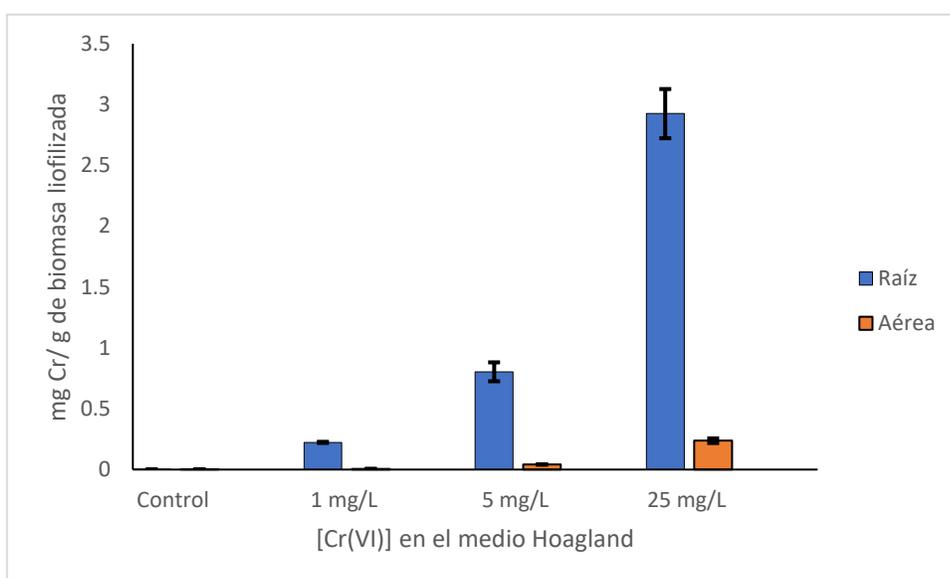


Figura 16. Gráfica de barras de las medias de la concentración de Cr en las muestras con su respectiva desviación estándar para cada uno de los grupos.

Para el análisis estadístico en XCMS, en una primera instancia se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) tanto para la parte raíz como para la parte aérea. En la Figura 17 son presentadas las dos gráficas de distribución de muestras en el espacio de los dos primeros componentes principales (PCA1, PCA2), donde para la raíz se observa una clara separación de muestras pertenecientes a cuatro grupos, de acuerdo con las condiciones de exposición de la planta a Cr(VI). En el modelo PCA obtenido para las partes aéreas, la agrupación de muestras en cuatro clusters es mucho menos notoria. Por esta razón, el trabajo posterior se enfocó en los datos obtenidos para la raíz. La plataforma XCMS arrojó 18527 características moleculares, los cuales fueron sometidas al algoritmo mummichog. Dicho

algoritmo asigna rutas metabólicas a una serie de características moleculares, encontrándose 93 rutas metabólicas con base en los datos LC-MS.

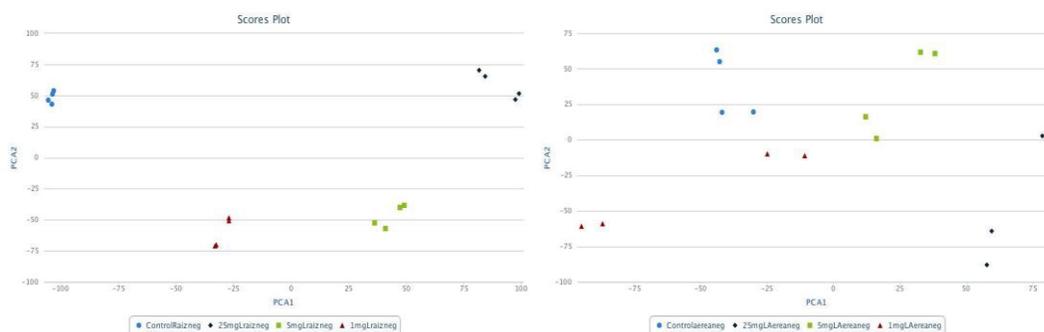


Figura 17. PCA de los datos obtenidos de la raíz (izquierda) y de la parte aérea (derecha) del girasol. Las unidades se encuentran en unidades de varianza y están centrados.

Tabla 12. Primeras 10 rutas metabólicas con mayor número de características moleculares asociadas a estas.

Ruta metabólica	Metabolitos que coinciden	Tamaño de la ruta	Valor p
Biosíntesis de cumarinas simples	18	18	0.00064
Biosíntesis de fenilpropanoides	15	16	0.00064
Biosíntesis de cutina	12	13	0.00068
Biosíntesis de ácidos grasos polihidroxilados	12	14	0.00074
Biosíntesis de ácido clorogénico	8	8	0.00077
Biosíntesis de traumatin y (Z)-3-hexen-1-yl acetato	11	13	0.00082
Biosíntesis de ácido fenilpropanoide	7	7	0.0009
Biosíntesis de cumarina (via 2-coumarato)	7	7	0.0009
Biosíntesis de ferulato y sinapato	7	7	0.0009
Biosíntesis de esculetin	6	6	0.00116

Es de notar que las primeras rutas con mayor número de características moleculares asociadas corresponden a la biosíntesis de cumarinas y fenilpropanoides (Tabla 12), lo que parece soportar los resultados obtenidos en la etapa anterior. Por otra parte, en la Tabla 12 aparece la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos con 12 metabolitos detectados entre 14 pertenecientes a esta ruta. En particular, dentro de la ruta metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos, las coincidencias encontradas apuntan al metabolismo del ácido linoleico ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?han00591](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?han00591)) en la cual, mediante procesos

de oxidación, se forma una serie de especies polihidroxiladas. El efecto de Cr(VI) en esta ruta es interesante debido al su carácter pro-oxidante que se manifiesta en la generación de las ROS y sucesiva peroxidación lipídica.

Los datos LC-MS fueron analizados por XCMS con el fin de detectar aquellas características moleculares que muestran diferencias significativas (ANOVA) entre los grupos. En este enfoque, se comparan abundancias de las características moleculares ya asignadas a rutas metabólicas o módulos, pero aun sin su identificación. Así una ruta metabólica que muestra una actividad biológica o un enriquecimiento tendrá más posibilidades de darle identidad a las características moleculares que una distribución aleatoria[138].

El análisis de datos LC-MS, con este enfoque reveló los más importantes cambios para los metabolitos de la ruta del ácido linoleico. Dicho resultado es consistente con la alta cantidad de aceites esenciales que contiene girasol, el cual es especialmente rico en ácido linoleico (55-70% del total de aceites) [139]. Para cada una de las 12 características moleculares asignados a la ruta metabólica del ácido linoleico, en las Figuras 18 y 19 se presentan intensidades de las respectivas señales registradas para extractos obtenidos en diferentes condiciones de exposición a Cr(VI). Como se puede observar en estas Figuras, abundancias de todos metabolitos presentaron un incremento paulatino conforme incrementaba la concentración de Cr(VI) en el medio, lo que indica que Cr(VI) juega un rol en la oxidación del ácido linoleico dentro de la ruta mencionada.

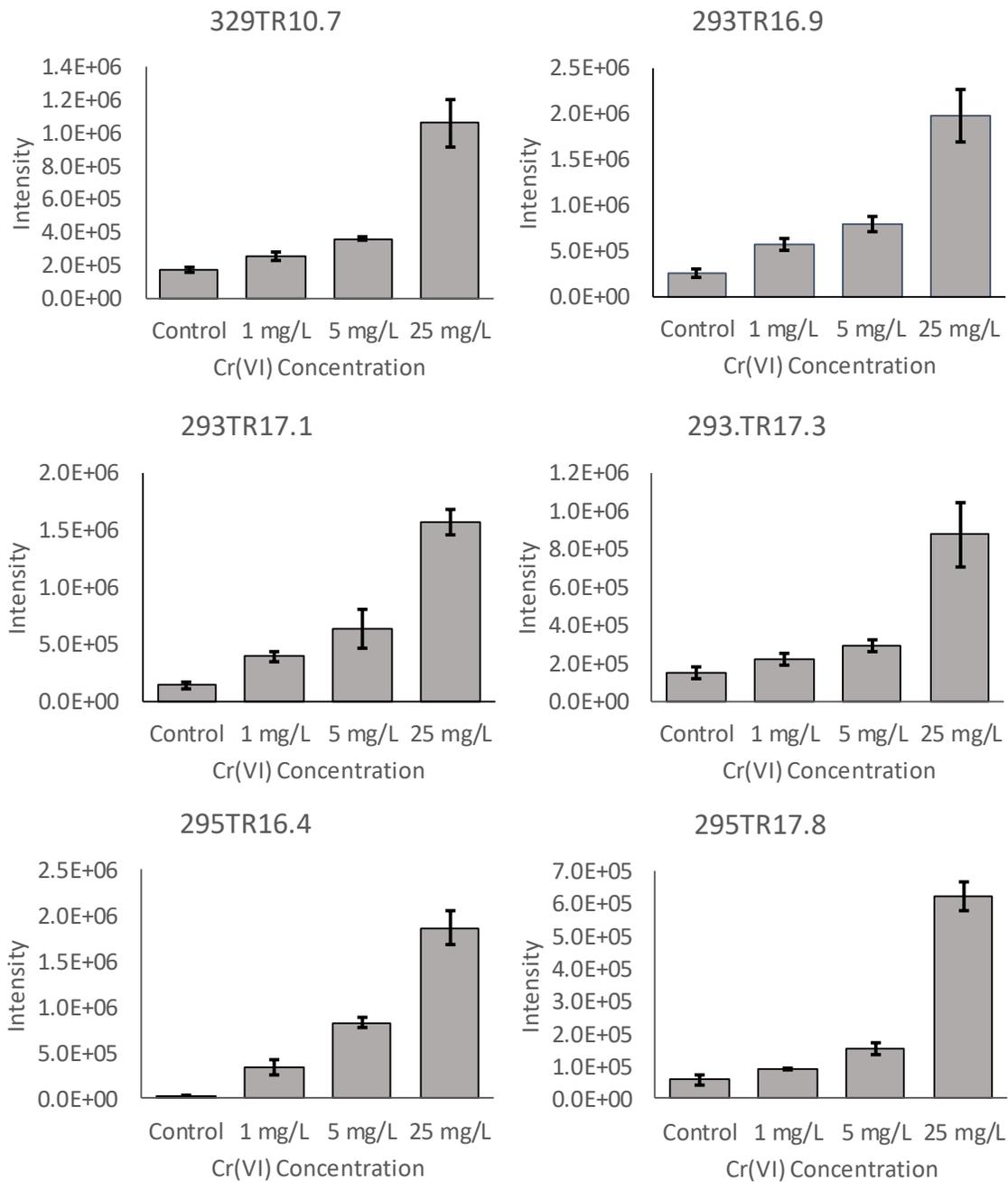


Figura 18. Efecto de la concentración de Cr(VI) en medio de cultivo sobre la abundancia de primeras seis características moleculares asignadas a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En las leyendas de las gráficas, se anota la masa nominal del ion seguida por su tiempo de retención. Se presentan valores de medias con respectivas desviaciones estándar, evaluadas para cuatro replicas (2 biológicas y dos técnicas).

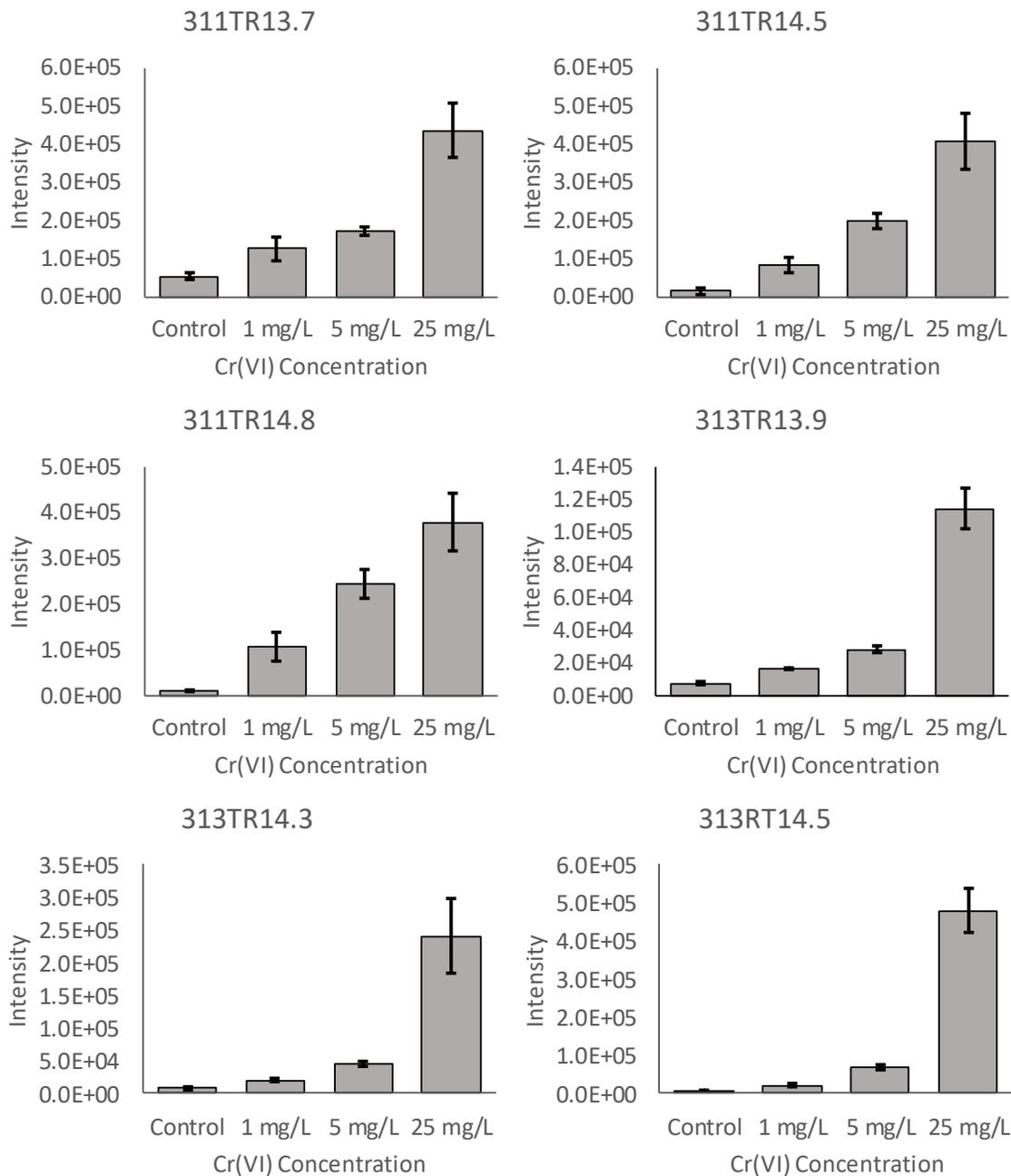


Figura 19. Efecto de la concentración de Cr(VI) en medio de cultivo sobre la abundancia de restantes seis características moleculares asignadas a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En las leyendas de las gráficas, se anota la masa nominal del ion seguida por su tiempo de retención. Se presentan valores de medias con respectivas desviaciones estándar, evaluadas para cuatro replicas (2 biológicas y dos técnicas).

Para aportar evidencia acerca de la oxidación del ácido linoleico se hizo un análisis de los espectros de masas/masas; siguiendo la estrategia empleada en la sección anterior, es decir por medio de las herramientas MS-Finder y SIRIUS. En una primera instancia se revisó la composición elemental de los compuestos; ambas herramientas arrojaron las mismas fórmulas bajo el criterio de alto puntaje; dichas formulas se presentan en la Tabla 13. Es importante señalar que varias de las características moleculares presentaron el mismo valor  $m/z$  pero diferentes tiempos de retención, lo que sugiere presencia de isómeros del mismo compuesto. En el segundo paso, se analizaron los datos MS/MS en búsqueda de las estructuras de los compuestos (Tabla 14).

Tabla 13. Composición elemental mejor puntuada utilizando SIRIUS (S) y MS-Finder (MF) para cada característica molecular con su tiempo de retención (TR).

TR	$m/z$ exp	$m/z$ teórica	SIRIUS puntuación	MF puntuación (Max=5)	Composición elemental
16.9	293.2134	293.2111	100%	4.6	$C_{18}H_{30}O_3-H$
17.1	293.2134	293.2111	100%	4.6	$C_{18}H_{30}O_3-H$
17.3	293.2134	293.2111	100%	4.6	$C_{18}H_{30}O_3-H$
10.7	329.2346	329.2322	100%	4.7	$C_{18}H_{34}O_5-H$
16.4	295.2291	295.2268	100%	4.5	$C_{18}H_{32}O_3-H$
17.8	295.2291	295.2268	100%	4.1	$C_{18}H_{32}O_3-H$
13.7	311.2241	311.2217	100%	4.4	$C_{18}H_{32}O_4-H$
14.5	311.2244	311.2217	100%	3.7	$C_{18}H_{32}O_4-H$
14.8	311.2239	311.2217	100%	4.2	$C_{18}H_{32}O_4-H$
13.9	313.2397	313.2373	100%	4.4	$C_{18}H_{34}O_4-H$
14.3	313.2398	313.2373	100%	4.3	$C_{18}H_{34}O_4-H$
14.5	313.2397	313.2373	100%	4.2	$C_{18}H_{34}O_4-H$
20.0	279.2335	279.2319	100%	4.4	$C_{18}H_{32}O_2-H$

Tabla 14. Tabla con las primeras tres estructuras mejor puntuadas (Rank) para CSI:Fingerid (IF) y MS-Finder (MF) para las doce características moleculares.

TR	mz Teórica	Rank	SMILES (IF)	SMILES (MF)
16.9	293.2134	1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(O)CC=CCC</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(=O)CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(=O)CCCC</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC(=O)C=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>
17.1		1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CC=CCC=CCC)</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(=O)CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCC=CCC</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)CC=CC=CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>
17.3		1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(=O)CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCC=CCC</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CC=CCC=CCC)</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=C(O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(=O)C=CC=CCCCC</chem>
10.7	329.2322	1	<chem>OC(C=CC(O)CCCC)C(O)CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC(O)C(O)CCCC</chem>
		2	<chem>CCCCC(O)C(O)C=CC(O)CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)C=CC(O)CCCC</chem>
		3	<chem>OC(C=CC(O)CCCCCCCC(=O)O)C(O)CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCC(O)CCC(O)C=CCC(O)CCCCC</chem>
16.4	295.2268	1	<chem>CCCCC(O)C=CC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CC=CCCCC)</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC(O)C=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(O)CCCC</chem>
17.8		1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=C(O)CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=C(O)CCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CC=CCCCC)</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC=CC(O)CCCC</chem>
13.7	311.2217	1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>CCCCC(C=CC=CCCCCCCC(=O)O)OO</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CCC=CCCCC</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CC(O)C=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCC=CCC</chem>
14.5		1	<chem>CCCCC(C=CC=CCCCCCCC(=O)O)OO</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CCC=CCCCC</chem>
		3	<chem>CCC=CCC(C=CCCCCCCCCCCC(=O)O)OO</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCC=CCC</chem>
14.8		1	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>CCCCC(C=CC=CCCCCCCC(=O)O)OO</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C=CCC=CCCCC</chem>
		3	<chem>CCC=CCC(C=CCCCCCCCCCCC(=O)O)OO</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCC=CCC</chem>
13.9	313.2373	1	<chem>CCCCC(O)C(O)C=CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CCC(O)C(O)CCCC</chem>
		2	<chem>OC(C=CCCCCCCC(=O)O)C(O)CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCCCC</chem>
		3	<chem>CCCCC(O)C(O)CC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CCCCCCO)</chem>
14.3		1	<chem>CCCCC(O)C(O)C=CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>OC(C=CCCCC)C(O)CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CCC(O)C(O)CCCC</chem>
		3	<chem>OC(C=CCCCCCCC(=O)O)C(O)CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CCCCCCO)</chem>
14.5		1	<chem>OC(CC=CCCCC)C(O)CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)C(O)CC=CCCCC</chem>
		2	<chem>CCCCC(O)C(O)CC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC=CCC(O)C(O)CCCC</chem>
		3	<chem>O=C(O)CCCCCCCC(O)CCC=CCCCC</chem>	<chem>O=C(O)CCCCCCCC1OC1(CCCCCCO)</chem>

Cabe señalar que el ácido linoleico fue asignado a la característica molecular con el valor  $m/z$  experimental 279.2335 y con tiempo de retención en el minuto 20. Las diferencias de masas entre el ácido linoleico y los compuestos señalados en la Tabla 12 pudieron ser explicados en función de la adición de oxígenos e hidrógenos como resultado de una oxidación; específicamente, se detectó la adición de 1, 2 o 3 oxígenos sin cambio del número de carbonos en las moléculas. En la Tabla 13 se presenta lista de estructuras sugeridas mediante dos plataformas independientes (SCI-FingerID y MS-Finder) para cada una de las fórmulas moleculares, incluyendo en cada caso tres estructuras de mayor puntuación. Obviamente, los tiempos de retención varían dependiendo del número de oxígenos en la molécula, obteniendo mayor tiempo de retención (20 minutos) para el ácido linoleico y menor tiempo de retención para aquel compuesto que obtuvo 5 oxígenos en su composición elemental. De manera de ejemplo, en la Figura 20 se presentan cromatogramas de siete iones extraídos a partir del cromatograma TIC correspondiente a extracto de raíz expuesto a 25 mg/L Cr(VI); los iones extraídos corresponden a las características moleculares de la Tabla 12, presentando estructuras encontradas para cada uno de ellos. El orden de elución está de acuerdo con decreciente polaridad de compuestos, lo que adicionalmente confirma su adecuada asignación.

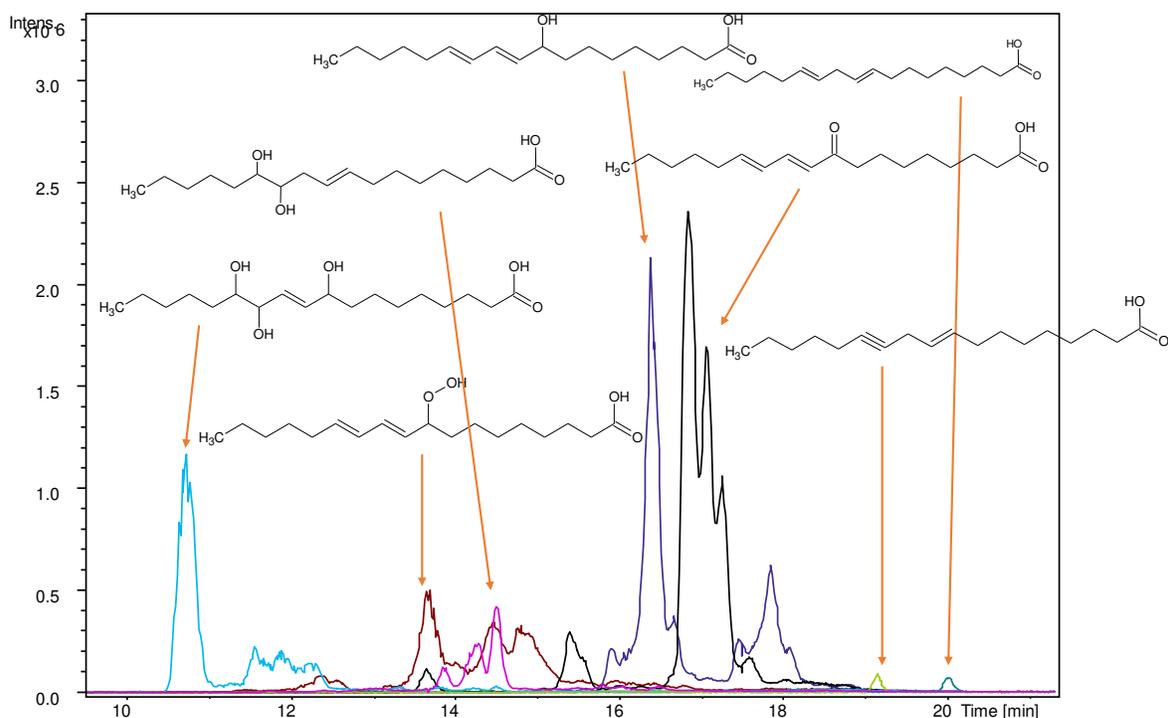


Fig. 20. Cromatogramas extraídos de iones correspondientes a siete de las características moleculares de la Tabla 12, los EIC se obtuvieron a partir del TIC de extracto de raíz expuesto a 25 mg/L Cr(VI). Para cada ion extraído se presenta su estructura sugerida.

Una vez teniendo las estructuras de las características moleculares que pertenecen a la ruta metabólica del ácido linoleico y las cuales aumentaron su abundancia bajo exposición de la planta a Cr(VI), se intentó entender el papel de Cr(VI) a nivel molecular. En la Figura 21, se presenta la ruta metabólica del ácido linoleico disponible en la base de datos de KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?han00591](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?han00591)) para la planta de girasol marcando en este esquema los compuestos asignados con base en el análisis de datos LC-MS y MS/MS.



Cr(VI) en contacto directo con el ácido linoleico. Para ello, se prepararon tres mezclas: cada una de ellas contenía 3.75 mg/L del ácido linoleico al que se agregó Cr(VI) para tener su concentración final 50 y 150 mg/L en 60% de acetonitrilo en agua; la tercera mezcla contenía solamente el ácido linoleico y el solvente (ACN:H<sub>2</sub>O 60:40). Después de incubación de 15 días en la obscuridad, las mezclas se analizaron por medio de cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada mediante ESI a un espectrómetro de masas con trampa de iones. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 22, observándose un decremento paulatino de la intensidad del pico correspondiente a la m/z del ácido linoleico conforme se aumenta la concentración de Cr(VI). Cabe señalar que en la muestra incubada sin Cr(VI), aparecen señales con menor tiempo de retención que corresponden a m/z 293 asignada a los metabolitos llamados oxoODE – productos de oxidación del ácido linoleico con un átomo de oxígeno agregado en forma de carbonilo (Tabla 13, Figura 21). Este resultado indica una oxidación parcial del reactivo; lo que es importante, sin embargo, la intensidad de las señales correspondientes a especies oxidadas claramente aumentó en presencia de Cr(VI) y de manera más notoria empleando mayor concentración de Cr(VI). Estos resultados confirman la participación de Cr(VI) como aceptor de electrones en la oxidación del ácido linoleico.

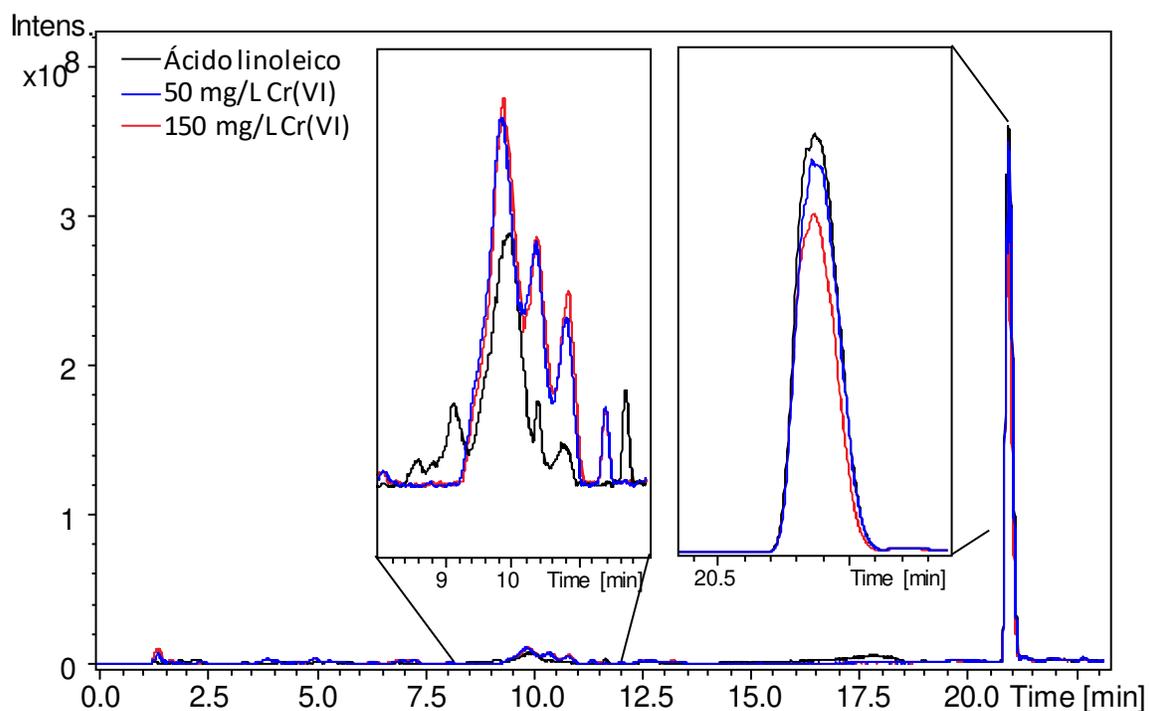


Figura 22. Empalme de los tres cromatogramas de conteo total de iones (TIC) de las muestras de ácido linoleico (3.75 mg/L) con dos distintas concentraciones de Cr(VI) (50 y 150 mg/L).

#### 4.4.5 Conclusiones.

Cuatro grupos de plantas de girasol fueron sometidas a estrés abiótico impuesto por Cr(VI) a diferentes concentraciones (0, 1, 5 y 25 mg/L). Se realizó un análisis de Cr total en cada uno de los grupos en la raíz y en la parte aérea de la planta obteniendo como resultado concentraciones 12 veces mayor en raíz que en la parte aérea para el caso del grupo expuesto a 25 mg/L de Cr(VI). A la par, los extractos fueron analizados por medio de capHPLC-ESI-QTOF en modo de ionización negativo y los datos provenientes de los extractos de la raíz mostraron claras diferencias entre grupos después de aplicarles un PCA, bajo este contexto se revisaron las relaciones de las características moleculares con diferencias significativas (ANOVA) con las rutas metabólicas por medio del algoritmo mummichong. Los resultados arrojaron doce compuestos que coincidieron con productos de la oxidación del ácido linoleico incluidos en su ruta metabólica descrita para la planta de girasol. Para aportar evidencia se analizaron los espectros de masas/masas por medio de los programas SIRIUS/CSI:FingerID y MS-Finder arrojando como resultado estructuras derivadas del ácido linoleico. Por otra parte, el ácido linoleico fue incubado con dos distintas concentraciones de Cr(VI) (50 y 150 mg/L) y analizados por HPLC-ESI-ITMS donde se observó que conforme se aumentaba la concentración de Cr(VI) decrecía la cantidad de ácido linoleico e iban en aumento los productos de su oxidación. En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el estrés impuesto por Cr(VI) en la planta de girasol activa la ruta metabólica del ácido linoleico, observándose aumento de sus metabolitos formados en procesos de oxidación. En cuanto al mecanismo subyacente, se propone de la interacción directa del Cr(VI) con el ácido linoleico.

#### 5. Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se abordaron varios temas relacionados con el efecto de estrés abiótico en organismos vivos a nivel del metaboloma, utilizando acoplamiento de separación cromatográfica con espectrometría de masas (LC-MS, GC-MS) y diferentes plataformas de análisis de datos. En cuanto a los agentes estresantes, se consideraron el cromo hexavalente y el ion cadmio, mientras que los organismos fueron principalmente plantas (*Helianthus annuus*, *Lepidium sativum*) y bacterias (*Bacillus cereus*). Se analizaron

también orinas de pacientes diabéticos con diferente grado de complicaciones y de sujetos sanos. Entre diferentes enfoques de metabolómica, se llevó a cabo la determinación de compuestos específicos (poliaminas biogénicas, aminoácidos), se realizaron estudios tipo metabolómica “untargeted” y se estudió la ruta metabólica de ácido linoleico en girasol. En la primera parte centrada en la determinación de compuestos específicos, se desarrollaron nuevos procedimientos analíticos demostrando su utilidad en cuantificación de cambios provocados por un estrés o por una enfermedad. En la segunda parte, el punto clave fue el análisis de datos LC-MS obtenidos para las muestras provenientes de plantas expuestas a Cr(VI) respecto controles. Además de los programas de software de la compañía Bruker (fabricante de los equipos de MS utilizados en este trabajo) tales como DataAnalysis y ProfileAnalysis, se utilizaron plataformas de metabolómica de libre acceso en la red: XCMS, SIRIUS, CSI:Finger ID, MS-Finder. Como estrategia de asegurar lo mejor posible la confiabilidad de los resultados, en cada uno de los pasos del análisis de datos, se comparaban resultados arrojados por diferentes herramientas pasando al siguiente paso solamente aquellos que coincidían.

A continuación, se presentan las conclusiones formuladas para cuatro temas desarrollados en el presente trabajo.

#### 1. Evaluación del efecto de Cr(VI) sobre el perfil de aminoácidos en *Bacillus cereus*

- Se ha demostrado que, el marcaje diferencial de los aminoácidos *in vivo*, mediante el uso de  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  como componente del medio de cultivo mínimo para bacterias expuestas a Cr(VI) y el uso de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , en medios de crecimiento de bacterias controles, permite evaluar de manera semicuantitativa cambios en el perfil de aminoácidos intracelulares de *B. cereus* bajo estrés por Cr(VI).

- El procedimiento adoptado consistió en: (i) mezclar iguales cantidades de extractos de cultivo expuesto con el control, (ii) derivatizar aminoácidos con metil cloroformato (kit EZ:faast); (iii) adquirir cromatogramas GC-MS; (iv) realizar el análisis de datos con el fin de identificar compuestos individuales y evaluar cambios de su abundancia entre extractos de bacterias expuestas respecto no-expuestas (iones con el mismo tiempo de retención y  $\Delta m/z = 1$ ).

- Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de 5 mg/L Cr(VI) en el medio de cultivo provocó un aumento significativo de la concentración intracelular de alanina, ácido aminobutírico y valina en *B. cereus*.

2. Desarrollo de un procedimiento de determinación de aminas biogénicas por cromatografía de alta resolución acoplada a una trampa de iones por medio de electro nebulización y monitoreo de reacciones múltiples, para su aplicación en el análisis de sistemas biológicos bajo estrés abiótico.

- La aportación original en esta parte consistió en la aplicación de 4-fluoro-3-nitrobenzenotrifluoruro (FNBT) como agente derivatizante para la determinación de cuatro poliaminas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina) en muestras biológicas, por medio de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en modo de monitoreo de reacciones múltiples (HPLC-ESI-ITMS/MS).

- El procedimiento se llevó a cabo en los siguientes pasos: (i) adición de estándar interno (hexametildiamina); (ii) extracción con diclorometano para eliminar lípidos; (iii) derivatización con FNBT y extracción con hexano; (iv) análisis por HPLC-ESI-ITMS/MS. Con las condiciones experimentales e instrumentales seleccionadas en base a experimentos sistemáticos, los efectos de matriz de muestra (extractos de plantas, orina humana) fueron despreciables.

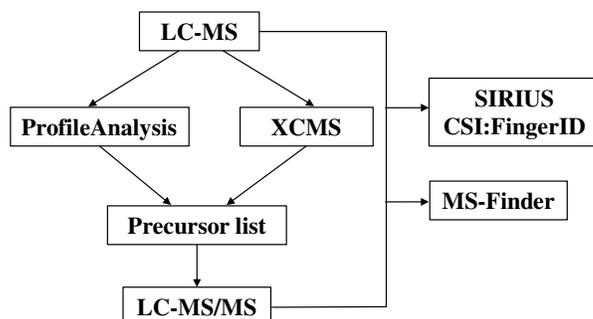
- Los porcentajes de recobro obtenidos por medio de la adición de estándares fueron en el intervalo 83.7-114.4% indicando una buena exactitud del procedimiento. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el nivel de fmol por inyección y fueron similares a esos reportados recientemente con el uso de instrumentación más poderosa respecto a la utilizada en este trabajo.

- Se demostró la capacidad del procedimiento propuesto para la determinación de las cuatro poliaminas a niveles fisiológicos y también se mostró su utilidad para detectar diferencias en la concentración de estos analitos en diferentes niveles de estrés abiótico o entre diferentes condiciones clínicas comparado con respectivos grupos controles.

- Los resultados obtenidos respecto a *L. sativum* son consistentes con el conocimiento actual, por otro lado, los datos obtenidos a partir del análisis de orina señalan el posible rol de las poliaminas libres como biomarcadores de diabetes.

3. Estudio metabolómico “untargeted” enfocado en la evaluación del impacto de Cr(VI) en raíz de girasol.

- El flujo de trabajo empleado en este estudio para obtener evidencia cuáles grupos de metabolitos fueron afectados por la presencia de Cr(VI) en cultivos hidropónicos de girasol se presenta en el esquemáticamente a continuación.



- Utilizando ProfileAnalysis y la plataforma de libre acceso XCMS, la selección de los iones precursores se llevó a cabo bajo los criterios de: (i) mínima abundancia del ion  $5 \times 10^4$  cps, (ii) razón de cambio de abundancia entre grupos expuesto respecto control  $\geq 5$ , y (III) valores de  $p \leq 0.01$ . Como resultados, se obtuvieron siete iones precursores.

- Las fórmulas moleculares fueron asignadas por medio de los algoritmos de SIRIUS y MS-Finder, seleccionando como posibles estructuras (o posibles familias a las que pertenecen) los tres candidatos mejor puntuados, arrojados por CSI:FingerID y MS-Finder, respectivamente.

- Se ha encontrado un incremento en la síntesis de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: isocumarinas, sesquiterpenos y compuestos fenólicos con lactonas, benzofuranos y glicósidos.

- Aunque la gran mayoría de los candidatos han sido previamente reportados en la familia Asteraceae y algunos de ellos en *Helianthus annuus*, la novedad del presente trabajo consiste en demostrar el aumento de su síntesis bajo estrés impuesto por Cr(VI). Los datos obtenidos sugieren enfocar posibles futuros estudios en la identificación de isocumarinas y sesquiterpenos.

4. Evaluación del efecto de Cr(VI) sobre la ruta del ácido linoleico en raíz de girasol, mediante herramientas de metabolómica.

- En congruencia con la sección anterior, el estudio se centró en el análisis de raíces de girasol debido a que esta parte morfológica presentó una mayor captación de Cr del medio de cultivo, respecto la parte aérea. El análisis PCA de los perfiles capHPLC-ESI-QTOFMS arrojó una buena separación de las muestras correspondientes a diferentes concentraciones de Cr(VI) solamente para los datos adquiridos para raíces, pero no para partes aéreas, lo que confirma el mayor impacto del agente estresante en la parte de raíz.

- En la aplicación del algoritmo mummichong, las características moleculares obtenidas a partir de los datos capHPLC-ESI-QTOFMS permitieron detectar varias rutas metabólicas, entre las cuales las de mayor coincidencia fueron las de isocumarinas, fenilpropanoides y de la biosíntesis de ácidos grasos polihidroxilados.

- Enfocándose en la oxidación del ácido linoleico, los resultados arrojaron doce compuestos que coincidieron con productos incluidos en su ruta metabólica descrita para la planta de girasol. Para aportar evidencia se analizaron los espectros de masas/masas por medio de los programas SIRIUS/ SCI:FingerID y MS-Finder arrojando como resultado estructuras derivadas del ácido linoleico.

- El impacto directo de Cr(VI) en la oxidación del ácido linoleico ha sido confirmado mediante pruebas in vitro: después de incubación de la mezcla Cr(VI) + ácido linoleico, el análisis LC-MS confirmó la presencia de típicos productos de oxidación, cuya abundancia crecía conforme aumentada la concentración de Cr(VI).

- En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el estrés impuesto por Cr(VI) en la planta de girasol activa la ruta metabólica del ácido linoleico, observándose aumento de sus metabolitos formados en procesos de oxidación. En cuanto al mecanismo subyacente, se propone la interacción directa del Cr(VI) con el ácido linoleico.

## 6. Bibliografía.

1. Lay, J.O., et al., *Problems with the "omics"*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(11): p. 1046-1056.
2. Fiehn, O., *Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks*. Comparative and functional genomics, 2001. **2**(3): p. 155-168.
3. Naz, S., et al., *Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics*. Journal of Chromatography A, 2014. **1353**: p. 99-105.
4. Klepacki, J., et al., *Amino acids in a targeted versus a non-targeted metabolomics LC-MS/MS assay. Are the results consistent?* Clinical Biochemistry, 2016. **49**(13): p. 955-961.
5. Armitage, E.G. and C. Barbas, *Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **87**: p. 1-11.
6. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(4): p. 285-294.
7. Castro-Puyana, M., et al., *Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **93**: p. 102-118.
8. Moretti, S., et al., *Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat*. Journal of Chromatography A, 2016. **1429**: p. 175-188.
9. Tian, H., et al., *Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2016. **1033**: p. 172-179.
10. Pizzini, S., et al., *Simultaneous determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons: a multi-analyte method applied to filter-feeding edible organisms*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. **408**(28): p. 7991-7999.
11. Kaczyński, P., *Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides*. Food Chemistry, 2017. **230**: p. 524-531.
12. Jandrić, Z., et al., *Assessment of fruit juice authenticity using UPLC-QToF MS: A metabolomics approach*. Food Chemistry, 2014. **148**: p. 7-17.
13. Guevara-Gonzalez, R. and I. Torres-Pacheco, *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. 2014: Springer.
14. Pichersky, E. and D.R. Gang, *Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective*. Trends in plant science, 2000. **5**(10): p. 439-445.
15. Duffus, J.H., *"Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report)*. Pure and applied chemistry, 2002. **74**(5): p. 793-807.
16. Michalak, A., *Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006. **15**(4).
17. Jacob, C., V. Jamier, and L.A. Ba, *Redox active secondary metabolites*. Current Opinion in Chemical Biology, 2011. **15**(1): p. 149-155.
18. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu. Rev. Plant Biol., 2004. **55**: p. 373-399.
19. Grassmann, J., S. Hippeli, and E.F. Elstner, *Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress*. Plant Physiology and Biochemistry, 2002. **40**(6): p. 471-478.
20. Yazaki, K., *ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites*. FEBS Letters, 2006. **580**(4): p. 1183-1191.
21. Yazaki, K., *Transporters of secondary metabolites*. Current Opinion in Plant Biology, 2005. **8**(3): p. 301-307.

22. t'Kindt, R., et al., *Joint GC–MS and LC–MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(29): p. 3572-3580.
23. Bertrand, S., et al., *Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery*. Biotechnology Advances, 2014. **32**(6): p. 1180-1204.
24. Reaves, M.L. and J.D. Rabinowitz, *Metabolomics in systems microbiology*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. **22**(1): p. 17-25.
25. Srivastava, A., et al., *Strategies for Extending Metabolomics Studies with Stable Isotope Labelling and Fluxomics*. Metabolites, 2016. **6**(4): p. 32.
26. Weindl, D., et al., *Isotopologue ratio normalization for non-targeted metabolomics*. Journal of Chromatography A, 2015. **1389**: p. 112-119.
27. Reaser, B.C., et al., *Non-targeted determination of 13C-labeling in the Methylobacterium extorquens AM1 metabolome using the two-dimensional mass cluster method and principal component analysis*. Journal of Chromatography A, 2016. **1432**: p. 111-121.
28. Villas-Bôas, S.G. and P. Bruheim, *Cold glycerol–saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells*. Analytical Biochemistry, 2007. **370**(1): p. 87-97.
29. Winder, C.L., et al., *Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(8): p. 2939-2948.
30. Bertini, I., X. Hu, and C. Luchinat, *Global metabolomics characterization of bacteria: pre-analytical treatments and profiling*. Metabolomics, 2014. **10**(2): p. 0.
31. Huang, C.-C., et al., *Use of urinary metabolomics to evaluate the effect of hyperuricemia on the kidney*. Food and Chemical Toxicology, 2014. **74**(0): p. 35-44.
32. Lam, C.-W., et al., *Quantitative metabolomics of urine for rapid etiological diagnosis of urinary tract infection: Evaluation of a microbial–mammalian co-metabolite as a diagnostic biomarker*. Clinica Chimica Acta, 2015. **438**(0): p. 24-28.
33. Struck-Lewicka, W., et al., *Urine metabolic fingerprinting using LC–MS and GC–MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (0).
34. Zhang, A.-h., et al., *Metabolomics in diabetes*. Clinica Chimica Acta, 2014. **429**(0): p. 106-110.
35. Gagnebin, Y., et al., *Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies*. Analytica chimica acta, 2017. **955**: p. 27-35.
36. Armirotti, A., et al., *Sample preparation and orthogonal chromatography for broad polarity range plasma metabolomics: Application to human subjects with neurodegenerative dementia*. Analytical Biochemistry, 2014. **455**(0): p. 48-54.
37. Bai, Y., et al., *Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Clinica Chimica Acta, 2014. **436**(0): p. 207-216.
38. Yoshimi, N., et al., *Blood metabolomics analysis identifies abnormalities in the citric acid cycle, urea cycle, and amino acid metabolism in bipolar disorder*. BBA Clinical, 2016. **5**: p. 151-158.
39. Dame, Z.T., et al., *The human saliva metabolome*. Metabolomics, 2015. **11**(6): p. 1864-1883.
40. Soini, H.A., et al., *Analysis of volatile organic compounds in human saliva by a static sorptive extraction method and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of chemical ecology, 2010. **36**(9): p. 1035-1042.

41. Ipolyi, I., et al., *Electron impact ionization of alanine: Appearance energies of the ions*. International Journal of Mass Spectrometry, 2006. **252**(3): p. 228-233.
42. Little, J. and A. Howard, *Qualitative Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analyses Using Amines as Chemical Ionization Reagent Gases*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2013. **24**(12): p. 1913-1918.
43. Van Berkel, G.J., S.A. McLuckey, and G.L. Glish, *Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(14): p. 1586-1593.
44. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(6): p. 898-917.
45. Kafka, A.P., et al., *The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **417**(1–2): p. 70-82.
46. Chang, W.C., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited*. Analytica Chimica Acta, 2007. **582**(1): p. 1-9.
47. Berkout, V.D. and V.M. Doroshenko, *Improving the Quality of the Ion Beam Exiting a Quadrupole Ion Guide*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(3): p. 335-340.
48. Jones, R.M., D. Gerlich, and S.L. Anderson, *Simple radio-frequency power source for ion guides and ion traps*. Review of scientific instruments, 1997. **68**(9): p. 3357-3362.
49. Guilhaus, M., *Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry*. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, 1995. **30**(1519): p. 1532.
50. Chernushevich, I.V., A.V. Loboda, and B.A. Thomson, *An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2001. **36**(8): p. 849-865.
51. March, R.E., *An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 1997. **32**(4): p. 351-369.
52. Miller, P.E. and M.B. Denton, *The quadrupole mass filter: basic operating concepts*. Journal of chemical education, 1986. **63**(7): p. 617.
53. Gika, H.G., et al., *Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **87**(0): p. 12-25.
54. Gika, H.G., I.D. Wilson, and G.A. Theodoridis, *LC–MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives*. Journal of Chromatography B, 2014. **966**(0): p. 1-6.
55. Yin, P. and G. Xu, *Current state-of-the-art of nontargeted metabolomics based on liquid chromatography–mass spectrometry with special emphasis in clinical applications*. Journal of Chromatography A, 2014. **1374**(0): p. 1-13.
56. Maree, J., et al., *The application of GC–MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2014. **130**(0): p. 172-181.
57. Tsugawa, H., et al., *Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014. **117**(1): p. 122-128.
58. Liebeke, M. and M. Lalk, *Staphylococcus aureus metabolic response to changing environmental conditions – A metabolomics perspective*. International Journal of Medical Microbiology, 2014. **304**(3–4): p. 222-229.
59. Weindl, D., et al., *Isotopologue ratio normalization for non-targeted metabolomics*. Journal of Chromatography A, 2015. **1389**(0): p. 112-119.

60. Wu, L., et al., *Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly <sup>13</sup>C-labeled cell extracts as internal standards*. Analytical Biochemistry, 2005. **336**(2): p. 164-171.
61. Persson, L., *Polyamine homeostasis*. Essays in biochemistry, 2009. **46**: p. 11-24.
62. Wallace, H.M., A.V. Fraser, and A. Hughes, *A perspective of polyamine metabolism*. Biochemical Journal, 2003. **376**(1): p. 1-14.
63. Alcázar, R., et al., *Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance*. Planta, 2010. **231**(6): p. 1237-1249.
64. Casero Jr, R.A. and L.J. Marton, *Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases*. Nature reviews Drug discovery, 2007. **6**(5): p. 373.
65. Gugliucci, A., *Polyamines as clinical laboratory tools*. Clinica Chimica Acta, 2004. **344**(1): p. 23-35.
66. Atiya Ali, M., et al., *Polyamines in foods: development of a food database*. Food & nutrition research, 2011. **55**(1): p. 5572.
67. Kalač, P. and P. Krausová, *A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods*. Food Chemistry, 2005. **90**(1): p. 219-230.
68. Sánchez-López, J., et al., *Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry*. Plant Physiology and Biochemistry, 2009. **47**(7): p. 592-598.
69. Önal, A., S.E.K. Tekkeli, and C. Önal, *A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods*. Food Chemistry, 2013. **138**(1): p. 509-515.
70. Henríquez-Aedo, K., et al., *Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(8): p. 2742-2750.
71. Jin, D., L. Wang, and Y.-I. Lee, *Determination of the polyamines in human toenails as 1-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-4-methylpiperazine derivatives using high-performance liquid chromatography*. Microchemical Journal, 2013. **110**: p. 568-574.
72. Fallon, K.M. and R. Phillips, *Polyamines in Relation to Growth in Carrot Cell Cultures*. Plant Physiology, 1988. **88**(1): p. 224-227.
73. Spragg, B.P. and A.D. Hutchings, *High-performance liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine and spermine after derivatisation with 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride*. Journal of Chromatography A, 1983. **258**: p. 289-291.
74. Sohn, H.-S., Y.-N. Park, and S.-R. Lee, *Effect of immobilization stress on brain polyamine levels in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats*. Brain Research Bulletin, 2002. **57**(5): p. 575-579.
75. Liu, R., et al., *A retrospective study of prostate cancer cases mimicking urothelial cell carcinoma of the bladder*. European Journal of Medical Research, 2013. **18**(1): p. 36.
76. Häkkinen, M.R., et al., *Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 2013. **941**: p. 81-89.
77. Bedia Erim, F., *Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **52**: p. 239-247.
78. Magnes, C., et al., *Polyamines in biological samples: Rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2014. **1331**: p. 44-51.
79. Ah Byun, J. and S.H. Lee, *Biomed. Chromatogr*, 2008. **22**: p. 73-80.
80. Liu, R., et al., *Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry*. Talanta, 2011. **83**(3): p. 751-756.

81. Chmielowska-Bąk, J., et al., *The new insights into cadmium sensing*. *Frontiers in plant science*, 2014. **5**: p. 245.
82. Groppa, M.D. and M.P. Benavides, *Polyamines and abiotic stress: recent advances*. *Amino Acids*, 2007. **34**(1): p. 35.
83. Pang, X.-M., et al., *Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants*. *Plant Stress*, 2007. **1**(2): p. 173-188.
84. JIANG, Q.-q., et al., *Relationship between polyamines metabolism and cell death in roots of Malus hupehensis Rehd. under cadmium stress*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012. **11**(7): p. 1129-1136.
85. Yang, H., et al., *Involvement of polyamines in adaptation of Potamogeton crispus L. to cadmium stress*. *Aquatic Toxicology*, 2010. **100**(3): p. 282-288.
86. Deng, A., et al., *Increased expression of ornithine decarboxylase in distal tubules of early diabetic rat kidneys: are polyamines paracrine hypertrophic factors?* *Diabetes*, 2003. **52**(5): p. 1235-1239.
87. Nicoletti, R., et al., *Vitreous polyamines spermidine, putrescine, and spermine in human proliferative disorders of the retina*. *British Journal of Ophthalmology*, 2003. **87**(8): p. 1038.
88. Liu, S.R., et al., *Determination and correlation analysis of contents of putrescine, cadaverine, and histamine in necrotic tissue, blood, and urine of patients with diabetic foot*. *Chinese Journal of Burns*, 2013. **29**(6): p. 526-530.
89. Cecco, L., et al., *Pattern and concentration of free and acetylated polyamines in urine of cirrhotic patients*. *The International journal of biological markers*, 1992. **7**(1): p. 52-58.
90. Liu, R., et al., *Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method: Application to identify potential markers for human hepatic cancer*. *Analytica chimica acta*, 2013. **791**: p. 36-45.
91. Häkkinen, M.R., et al., *Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC–MS/MS*. *Journal of Chromatography B*, 2013. **941**: p. 81-89.
92. Park, M.H. and K. Igarashi, *Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases*. *Biomolecules & therapeutics*, 2013. **21**(1): p. 1.
93. Booth, S.C., et al., *Metabolomics and its application to studying metal toxicity*. *Metallomics*, 2011. **3**(11): p. 1142-1152.
94. Jones, O.A., et al., *The use of metabolomics in the study of metals in biological systems*. *Metallomics*, 2015. **7**(1): p. 29-38.
95. Dubey, S., et al., *Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress*. *BMC genomics*, 2010. **11**(1): p. 648.
96. Scalabrin, E., et al., *Metabolomic analysis of wild and transgenic Nicotiana langsdorffii plants exposed to abiotic stresses: unraveling metabolic responses*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2015. **407**(21): p. 6357-6368.
97. Hayat, S., et al., *Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview*. *Protoplasma*, 2012. **249**(3): p. 599-611.
98. Shahid, M., et al., *Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review*. *Chemosphere*, 2017. **178**: p. 513-533.
99. Mani, D., et al., *Phytoremediation potential of Helianthus annuus L in sewage-irrigated Indo-Gangetic alluvial soils*. *International journal of phytoremediation*, 2012. **14**(3): p. 235-246.
100. Kind, T. and O. Fiehn, *Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry*. *BMC bioinformatics*, 2007. **8**(1): p. 1.

101. Yi, L., et al., *Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review*. Analytica chimica acta, 2016. **914**: p. 17-34.
102. Ernst, M., et al., *Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing*. Natural product reports, 2014. **31**(6): p. 784-806.
103. de Souza, L.P., et al., *From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web-resources for mass spectral plant metabolomics*. GigaScience, 2017.
104. Jorge, T.F., et al., *Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress*. Mass spectrometry reviews, 2016. **35**(5): p. 620-649.
105. Mahieu, N.G., J.L. Genenbacher, and G.J. Patti, *A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics*. Current Opinion in Chemical Biology, 2016. **30**: p. 87-93.
106. Çelebier, M., *Software and Database Usage on Metabolomic Studies: Using XCMS on LC-MS Data Analysis*. Archives Medical Review Journal, 2014. **23**(2): p. 168-185.
107. Kind, T. and O. Fiehn, *Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm*. BMC bioinformatics, 2006. **7**(1): p. 1.
108. Tsugawa, H., et al., *Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(16): p. 7946-7958.
109. Sebastian, B., et al., *SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification*. Bioinformatics, 2009. **25**(2).
110. Mei, B., J.D. Puryear, and R.J. Newton, *Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species*. Plant and Soil, 2002. **247**(2): p. 223-231.
111. Akula, R. and G.A. Ravishankar, *Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants*. Plant signaling & behavior, 2011. **6**(11): p. 1720-1731.
112. Selmar, D. and M. Kleinwächter, *Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products*. Plant and Cell Physiology, 2013. **54**(6): p. 817-826.
113. Gutierrez, M.-C., et al., *Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower*. Phytochemistry, 1995. **38**(5): p. 1185-1191.
114. Saeed, A., *Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities*. European journal of medicinal chemistry, 2016. **116**: p. 290-317.
115. Engelmeier, D., et al., *Antifungal 3-butylisocoumarins from asteraceae-anthemideae*. Journal of natural products, 2004. **67**(1): p. 19-25.
116. Hartwell, J.L. and B.J. Abbott, *Antineoplastic principles in plants: recent developments in the field*, in *Advances in pharmacology*. 1970, Elsevier. p. 117-209.
117. Scotti, M.T., et al., *Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2007. **15**(8): p. 2927-2934.
118. Prasifka, J.R., et al., *Sesquiterpene lactone composition of wild and cultivated sunflowers and biological activity against an insect pest*. Journal of agricultural and food chemistry, 2015. **63**(16): p. 4042-4049.
119. Spring, O., et al., *The nonvolatile metabolome of sunflower linear glandular trichomes*. Phytochemistry, 2015. **119**: p. 83-89.
120. Raupp, F.M. and O. Spring, *New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for Orobanche cumana*. Journal of agricultural and food chemistry, 2013. **61**(44): p. 10481-10487.

121. Minto, R.E. and B.J. Blacklock, *Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products*. Progress in lipid research, 2008. **47**(4): p. 233-306.
122. Proksch, P. and E. Rodriguez, *Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance*. Phytochemistry, 1983. **22**(11): p. 2335-2348.
123. Yang, G., W. Zhao, and T. Zhang, *Chromone derivatives from the leaves of Nicotiana tabacum and their anti-tobacco mosaic virus activities*. Heterocycles: an international journal for reviews and communications in heterocyclic chemistry, 2014. **89**(1): p. 183-188.
124. Korkina, L., *Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health*. Cell Mol Biol, 2007. **53**(1): p. 15-25.
125. Chadwick, M., et al., *Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(6): p. 12780-12805.
126. Richards, L.A., et al., *Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores*. Phytochemistry reviews, 2016. **15**(6): p. 1153-1166.
127. Shikishima, Y., et al., *Chemical constituents of Prangos tschimganica; structure elucidation and absolute configuration of coumarin and furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2001. **49**(7): p. 877-880.
128. Elguera, J.C.T., et al., *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**(2): p. 431-441.
129. Kováčik, J., et al., *Lignification and related parameters in copper-exposed Matricaria chamomilla roots: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO in this process*. Plant science, 2010. **179**(4): p. 383-389.
130. Ahmad, P., et al., *Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance*. Frontiers in plant science, 2016. **7**: p. 813.
131. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochemical journal, 1984. **219**(1): p. 1.
132. Stohs, S.J. and D. Bagchi, *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **18**(2): p. 321-336.
133. Sinha, S., R. Saxena, and S. Singh, *Chromium induced lipid peroxidation in the plants of Pistia stratiotes L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes*. Chemosphere, 2005. **58**(5): p. 595-604.
134. Verma, S. and R. Dubey, *Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants*. Plant Science, 2003. **164**(4): p. 645-655.
135. Gómez-Romero, M., A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, *Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit*. Phytochemistry, 2010. **71**(16): p. 1848-1864.
136. Moco, S., et al., *A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato* Plant Physiol, 2006. **141**(4): p. 1205-1218.
137. Li, N., et al., *Recent developments in sample preparation and data pre-treatment in metabolomics research*. Arch Biochem Biophys, 2016. **589**(1): p. 4-9.
138. Li, S., et al., *Predicting network activity from high throughput metabolomics*. PLoS computational biology, 2013. **9**(7): p. e1003123.
139. Premnath, A., et al., *Mapping quantitative trait loci controlling oil content, oleic acid and linoleic acid content in sunflower (Helianthus annuus L.)*. Molecular breeding, 2016. **36**(7): p. 106.
140. Niki, E., et al., *Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **338**(1): p. 668-676.

