

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUIMICA

**“ESTUDIO ANALÍTICO DE LOS EFECTOS DE SELENIO COMO ESTRATEGIA
DE BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE DIFERENTES ESPECIES
VEGETALES COMESTIBLES”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRÍA EN CIENCIA
QUÍMICA**

PRESENTA:

OSCAR DAVID GUEVARA MORENO

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “**Estudio analítico de los efectos de selenio como estrategia de biofortificación de germinados de diferentes especies vegetales comestibles**”, realizado por el Q. Oscar David Guevara Moreno, para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Co-Director:

Dra. Katarzyna Wrobel

Sinodales

Dra. Kazimierz Wróbel
Presidente

Dr. Alan Alexander González Ibarra
Secretario

Dra. Armando Gómez Ojeda
Vocal

Dr. Francisco Acevedo Aguilar
Suplente

Índice general

Índice de Figuras.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de abreviaciones.....	13
1 CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN	15
1.1 Biofortificación de plantas comestibles con micronutrientes como estrategia de obtener alimentos funcionales.....	16
1.1.1 Biofortificación de las plantas	18
1.1.1.1 Biofortificación de las plantas con Se	20
1.2 Suplementos dietéticos de selenio: formas y especies de interés.....	23
1.3 Ventajas de biofortificación de germinados	24
1.4 Tareas analíticas y herramientas utilizadas en estudios de biofortificación con selenio	27
1.5 Determinación de concentraciones totales de Se y de otros elementos en material de plantas.....	28
1.5.1 Espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES)	28
1.5.2 Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	29
1.6 Fraccionamiento/especiación de selenio.....	30
1.7 Análisis de metabolitos de interés en nutrición.....	32
2 CAPÍTULO II.....	34
2.1 Objetivo general	35
2.1.1 Objetivos particulares	35
3 CAPÍTULO III	36
3.1 Equipo de laboratorio	37
3.1.1 Equipos utilizados en procesamiento de muestra y preparación de reactivos.....	37
3.1.2 Instrumentación analítica.....	37
3.2 Reactivos y estándares	38
3.2.1 Reactivos para medio de crecimiento y exposición a Se.....	38

3.2.2	Reactivos para digestión ácida.....	38
3.2.3	Estándares para determinación de contenido total de Se, elementos traza, elementos mayoritarios y especiación de Se.	38
3.2.4	Reactivos para las reacciones de derivatización	38
3.2.5	Disolventes	38
3.3	Semillas empleadas	38
3.4	Software	39
3.4.1	Tratamiento de semillas previo a la germinación.....	39
3.4.2	Evaluación de condiciones de crecimiento	40
3.5	Tratamiento de muestra	40
4	CAPÍTULO IV	41
4.1	Antecedentes	41
4.2	Obtención de germinados de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de Se(IV).....	43
4.3	Esquema experimental propuesto.....	44
4.4	Estudio de captación y distribución subcelular de selenio y elementos traza en germinados mediante ICP-MS.....	45
4.5	Análisis ionómico	50
4.6	Análisis de componentes principales (PCA).....	53
4.7	Evaluación de biotransformación de selenio (IV) a selenio orgánico en germinados de alfalfa mediante análisis de especiación de selenio por HLPC-ICP-MS, LC-ESI-IT-MS y LC-ESI-QTOF-MS.....	57
4.7.1	Análisis de especiación de Se por HLPC-ICP-MS.....	57
4.7.2	Determinación de Se-aminoácidos por LC-ESI-ITMS en modo de MRM (monitoreo de reacciones múltiples).....	61
4.7.2.1	Extracción de Se-compuestos de tejidos vegetales	62
4.7.2.2	Protocolo de derivatización	62
4.7.2.3	Calibración	75
4.7.2.4	Determinación de Se-compuestos y aminoácidos en plantas por HPLC-ESI-IT-MS/MS.....	76
4.8	Análisis de extractos de cultivos vegetales por capHPLC-ESI-QTOF-MS77	
4.8.1	Condiciones instrumentales.....	77
4.8.2	Resultados y discusión	78

4.8.3	Análisis metabolómico de extractos de alfalfa por capHPLC-ESI-QTOF	81
4.9	ANÁLISIS DE METABOLITOS DE INTERÉS EN NUTRICIÓN	88
4.9.1	Extracción de metabolitos o preparación de muestras	91
5	Conclusiones	102
6	Bibliografía	104

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta propuesta de Captación, distribución y biotransformación de Se en plantas superiores. *Abreviaturas: SeCys, selenocisteína; SeMet, selenometionina; methyl-SeCys, metilselenocisteína; methyl-SeMet, metilselenometionina; DMDSe, dimetildiseleniuro; DMSe, dimetilseleniuro [22].	22
Figura 2. Cantidades de biomasa producidas dependiendo de la concentración de Se(IV) (0–5 mg Se L ⁻¹).	43
Figura 3. Fotos de los cultivos después de 10 días de crecimiento: control y los expuestos a 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg Se L ⁻¹ .	43
Figura 4. Esquema del procedimiento analítico que se llevará a cabo para evaluar los efectos de selenio en germinados.	44
Figura 5. Resultados del cálculo de BCF obtenido para las diferentes condiciones de germinación.	47
Figura 6. Análisis por el método de componentes principales (PCA) de los niveles de concentración de elementos (mayoritarios y minoritarios) encontrados en biomasa de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de Se(IV). Arriba: Gráfica bidimensional de la estructura de los datos (scores) en el sistema estudiado. Abajo: Gráfica bidimensional de las variables monitoreadas en el espacio definido por los componentes principales.	55
Figura 7. Típico cromatograma correspondiente a los estándares de las 4 especies de selenio determinadas Selenio inorgánico, Selenocisteína, Metilselenocisteína y Selenometionina (50 µg L ⁻¹).	59
Figura 8. Típico cromatograma HPLC-ICP-MS de estándares de selenio y de extracto de alfalfa expuesta a 5 mg L ⁻¹ .	60
Figura 9. Mecanismo general de la derivatización de una amina y de un ácido con propil cloroformato, la reacción de alquilación con propil cloroformato convierte al grupo amino y ácidos orgánicos en ésteres y carbamatos, respectivamente[86].	63
Figura 10. Cromatogramas EIC de una solución de estándares de aminoácidos (5 mg L ⁻¹).	64
Figura 11. Espectros de masas adquiridos para (a) Met, (b) MeSeCys, (c) SeMet, (d) Cys, (e) Cys2 y (f) SeCys2. El patrón de isótopos característico de Se se muestra en el recuadro expandido	66
Figura 12. Espectros de MS/MS de cada uno de los estándares de aminoácidos obtenidos a partir	69
Figura 13. Gráfico que representa el efecto de la energía de fragmentación sobre la intensidad de las señales de los iones en el espectro de MS/MS.	70
Figura 14. Cromatograma de una solución de estándares de aminoácidos (500 µg/L de cada compuesto) en modo MRM.	72

Figura 15. Cromatogramas MRM correspondientes a curva de calibración utilizando las concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los compuestos de selenio.	75
Figura 16. Cromatograma EIC correspondiente al ion cuatificador 247.99 m/z del precursor Cistina de 497 m/z.....	76
Figura 17. Cromatogramas de iones extraídos de una mezcla de estándares, analizada en el sistema capHPLC-ESI-QTOFMS (0.5 mg/L de cada compuesto).79	79
Figura 18. Patrones isotópicos experimentales y teóricos de los estándares de aminoácidos analizados por ESI-QTOF-MS: (a) Cys; (b) Cys ₂ ; (c) SeCys ₂	80
Figura 19. Patrones isotópicos experimentales de las especies de selenio desconocidas encontradas por capHPLC-ESI-QTOF-MS.....	81
Figura 21. Cromatogramas capHPLC-ESI-QTOF-MS (BPC, m/z 80 – 800) de extractos acuoso de germinados de alfalfa; se presenta la región de elución con mayores diferencias entre intensidades de señales, entre control y tratamiento con Se.....	83
Figura 22. Cromatogramas EIC del ion m/z 497 correspondiente al a cistina, obtenidos en el sistema capHPLC-ESI-QTOF-MS.....	84
Figura 23. Padrones isotópicos de cistina derivatizada con PCF obtenidos en el análisis por capHPLC-ESI-QTOF-MS.	84
Figura 24. Espectro de fragmentación del ion m/z 497 adquirido para estándar de cistina a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ por ESI(+)-QTOF-MS/MS.....	85
Figura 25. Espectros de fragmentación del ion m/z497 (cistina derivatizada) obtenido para el cultivo control y expuesta a Se(IV), 5 mg Se L ⁻¹ obtenidos por ESI(+)-QTOF-MS/MS.....	86
Figura 26. Los cromatogramas “dissect” obtenidos en el análisis de datos capHPLC-ESI-QTOF-MS: (a) Control y (b) 5 mg Se L ⁻¹	87
Figura 27. Grupos funcionales normalmente derivados por reactivos de sililación [91].	89
Figura 28. Derivatización de un hidrógeno activo con BSTFA [89]......	90
Figura 29. Cromatogramas típicos GC-MS de compuestos extraídos de plantas crecidas en presencia en presencia de diferentes concentraciones de Se (IV) en medio de cultivo, obtenidos después de la derivatización con BSTFA.....	92
Figura 30. Cromatogramas TIC adquiridos en el sistema GC-MS para extractos de raíz expuestos a Se(IV) y para el control (derivatizacion con BSTFA).....	93
Figura 31. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de los germinados de alfalfa (score). Para el componente PCA 1 la variación explicada es 49% y para PCA 2 un 24 %.....	94
Figura 32. Graficas de las variables monitoreadas en el espacio definido por los componentes principales 1 y 2.....	95

Figura 33. Grafica de nubes generada en XCMS a partir de los datos GC-MS para muestra control y expuesta a 5 mg Se L-1, con los siguientes parámetros: $p < 0.05$, $\text{fold change} \geq 1.5$ y $\text{intensidad} > 5 \times 10^4$	96
Figura 34. Se muestra el cromatograma de los picos detectados de la serie de alcanos.....	97
Figura 35. Comparación de los espectros experimentales (rojo) y del NIST (azul) perteneciente al estándar del D-Pinitol.....	99
Figura 36. Cromatograma TIC del pico perteneciente al D-pinitol.....	100
Figura 37. Conversión bioquímica de mioinositol en pinitol [94].....	101

Índice de tablas

Tabla 1. Nutrientes esenciales conocidos para la vida humana [1, 3-5].	16
Tabla 2. Ejemplos de biofortificación de plantas con microelementos y sus efectos de relevancia nutricional en la planta.	19
Tabla 3. Ejemplos de productos suplementados con Se. *Abreviaturas: SeCys, selenocisteína; SeMet, selenometionina; MeSeCys, metilselenocisteína; (SeCys) ₂ , selenocistina.	23
Tabla 4. Trabajos representativos de fraccionamiento/especiación de selenio	30
Tabla 5. Trabajos representativos de algunos metabolitos de interés	33
Tabla 6. Composición del medio de crecimiento Hoagland.	40
Tabla 7. Fracciones obtenidas del procedimiento de tratamiento de muestra propuesto	45
Tabla 8. Parámetros Instrumentales de ICP-MS para la determinación de contenido elemental	46
Tabla 9. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para Se por ICP- MS.	46
Tabla 10. Concentraciones de selenio total de germinado de alfalfa.	46
Tabla 11. Factor de captación biológica (BCF) para cada condición de germinación.	47
Tabla 12. Distribución de Se en las fracciones P1, P2 y S2.	48
Tabla 13. Valores de porcentaje de recuperación.	49
Tabla 14. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para cada uno de los elementos monitoreados por ICP- MS.	50
Tabla 15. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos minoritarios en material certificado NIST 1572.	50
Tabla 16. Niveles de concentración de elementos minoritarios encontrados en biomasa después de exposición a Se (IV).	51
Tabla 17. Parámetros Instrumentales de MP-AES para la determinación de contenido elemental.	51
Tabla 18. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para cada uno de los elementos monitoreados por MP-AES.	52
Tabla 19. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos mayoritarios en material certificado NIST 1572.	52
Tabla 20. Niveles de concentración de elementos mayoritarios encontrados en biomasa después de exposición a Se (IV).	53
Tabla 21. Principales procesos fisiológicos en los que participan elementos esenciales cuya captación se asocia directamente a la exposición a Se(IV).	56
Tabla 22. Parámetros Instrumentales de HPLC-ICP-MS para la determinación de especies de selenio.	58

Tabla 23. Tiempos de retención para cada especie de selenio determinada y especies encontradas en germinado de alfalfa tratadas con 5.0 mg Se L ⁻¹	59
Tabla 24. Condiciones instrumentales para el análisis de aminoácidos por ESI-IT-MS en el modo Full Scan.	70
Tabla 25. Condiciones Instrumentales para el MRM dividido en segmentos y sus respectivos tiempos de retención de cada aminoácido.	71
Tabla 26. Estructuras moleculares de Se-aminoácidos derivatizados, sus masa nominal (M) y con sus respectivos valores m/z para iones precursores, iones cuantificadores y calificadores.....	73
Tabla 27. Estructuras moleculares (Derivatizadas) de Se-aminoácidos, sus masas nominal (M) y sus respectivos valores de m/z para iones precursores, ion cuantificador y ion calificador	74
Tabla 28. Ecuaciones de regresión lineal obtenidos para tres compuestos de selenio por HPLC-ESI-ITMS/MS en el modo MRM; “y” es la señal analítica definida con el área de pico del analito y “x” es la concentración en mg L ⁻¹ del analito.....	75
Tabla 29. Condiciones cromatográficas e instrumentales del sistema capHPLC-ESI-QTOF-MS.....	77
Tabla 30. Compuestos derivatizados de la solución de estándares.	79
Tabla 31. Condiciones instrumentales para el análisis de metabolitos en plantas por GC-MS.	91
Tabla 32. Lista de precursores los cuales presentaron una regulación positiva al ser expuestas a Se (IV).	96
Tabla 33. Serie de n-alcanos detectados en CG-MS.....	98

Índice de abreviaciones

Símbolo	Descripción
(SeCys) ₂	Selenocistina
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdoSeHcy	Adenosilselenohomocisteína
ADP	Adenosín difosfato
AIA	Ácido Indol-3-Acético
ALA	Ácido δ-aminolevulínico
APS	Adenosina fosfosulfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	2- <i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol y 3- <i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol (mezcla)
BSTFA	N,O-bis(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
capHPLC-ESI-QTOF	Cromatografía de líquidos capilar acoplada a un espectrómetro de masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo por medio de electro nebulización como fuente de ionización
CI	Ionización química
CID	Ionización inducida por colisiones
cps	Cuentas por segundo
Cys	Cisteína
Cys ₂	Cistina
DMDSe	Dimetildiseleniuro
DMSe	Dimetilseleniuro
DTT	Ditiotreitól
EI	Ionización por impacto de electrones o electroionización
ESI	Ionización por electro nebulización
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electro nebulización
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas
GC-MS(TQ)	Cromatografía de gases con detector de masas de triple cuadrupolo
GPX	Glutación peroxidasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-ESI-ITMS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetro de masas con una trampa de iones por medio de electro nebulización
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización
IMT	Inositol metil transferasa
IP	Ion Precursor
IR	Índices de retención
IS	estándar interno
iSe	Especies inorgánicas de selenio
LC	Límite de cuantificación

LD	Límite de detección
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MALDI	Desorción/ionización laser asistida por matriz
MeMet	Metilmetionina
MeSeCys	MetilSelenoCisteína
MeSeMet	MetilSelenometionina
Met	Metionina
MM	Masa molecular
MP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
OAS	O-acetilserina
oSe	Especies orgánicas de Se
P1	Pastilla 1
P2	Pastilla 2
PCA	Análisis de componentes principales
PCF	Propilcloroformato
PCs	Componentes principales
PEP	Fosfoenolpiruvato
S/N	Relación señal-ruido
S1	Sobrenadante 1
S2	Sobrenadante 2
SAM	S-adenosil-1-metionina
SeAM	Se-adenosil-l-selenometionina
SeCys	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
SIM	Monitoreo de ion selectivo
SMT	Se-metiltransferasa
SOD	Superóxido dismutasa
TIC	Conteo total de iones
TOF	Tiempo de vuelo
TR	Tiempo de retención
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución
WGE	extracto de germen de trigo

1 CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Biofortificación de plantas comestibles con micronutrientes como estrategia de obtener alimentos funcionales

La deficiencia de micronutrientes provoca enfermedades o problemas en la salud humana que afectan a más de la mitad de la población mundial, con una mayor incidencia en familias de escasos recursos [1-3]. Los seres humanos requieren al menos 44 nutrientes conocidos en cantidades adecuadas y consistentemente para vivir una vida sana y productiva (Tabla 1) [3].

Tabla 1. Nutrientes esenciales conocidos para la vida humana [1, 3-5].

Aire, agua y energía	Proteínas (amino ácidos)	Lípidos-grasas (ácidos grasos)	Micronutrientes [1, 5]		
			Macro minerales	Elementos traza esenciales	Vitaminas
Oxígeno	Histidina	Ácido linoleico	Na	Fe	A (retinol)
Agua	Isoleucina	Ácido linolénico	K	Zn	D (calciferol)
Hidratos de carbono	Leucina		Ca	Cu	E (α-tocoferol)
	Lisina		Mg	Mn	K (filoquinona)
	Metionina		S	I	C (ácido ascórbico)
	Fenilalanina		P	F	B ₁ (tiamina)
	Treonina		Cl	Se	B ₂ (riboflavin)
	Triptófano			Mo	B ₃ (niacina)
	Valina			Co (en B ₁₂)	B ₅ (ácido pantoténico)
				B	B ₆ (pinoxidina)
				B ₇ (biotina)	
				B ₉ (ácido fólico, folacina)	
				B ₁₂ (cobalamina)	

Malnutrición y déficit de micronutrientes como Fe, I, Zn y vitamina A son síntomas de la crisis mundial y como resultado de sistemas alimentarios disfuncionales que no pueden entregar alimentos de calidad para satisfacer los requerimientos nutricionales de toda la población [1-3].

Debido a que los cultivos agrícolas son la principal fuente de todos los micronutrientes para los animales y los humanos, es ahí donde se pueden realizar mejoras que garanticen suministros consistentes y adecuados de todos los nutrientes esenciales, incluyendo micronutrientes. De esta manera, las intervenciones agrícolas es una herramienta cada vez más utilizada para mejorar el valor nutricional de los alimentos [1-3].

La aplicación de estrategias biotecnológicas es muy prometedora para mejorar la calidad de los productos agrícolas en términos de su contenido nutricional y de

esta manera producir alimentos funcionales [1, 2]. Una de dichas estrategias es la biofortificación (la cual se definirá con mejor detalle más adelante) de plantas comestibles con micronutrientes (selenio y otros elementos esenciales).

En este sentido podemos definir a los alimentos funcionales como cualquier tipo de alimento consumido en su forma natural o procesada, que además de los componentes nutritivos propios, contiene aditivos que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona [6]. Dentro del grupo de alimentos funcionales se encuentran los alimentos modificados, fortificados o enriquecidos. Se considera como alimento modificado a todo producto alimenticio cuya composición natural ha sido cambiada mediante adición de algunos nutrientes, especialmente vitaminas y minerales con el fin de restaurar o aumentar su valor nutricional. De manera más específica, los productos fortificados son aquellos a los cuales se les adicionó uno o varios nutrientes esenciales para aumentar su contenido natural y así satisfacer los requerimientos de ingesta diaria de los consumidores. El término fortificación, es aplicado también en aquellas situaciones en las que se añade un determinado nutriente a un alimento que originalmente carecía de él [6], para así llegar a tener un alimento funcional. Las diferentes categorías de alimentos funcionales dependen del procedimiento empleado para su obtención, estas categorías se presentan a continuación [7]:

- Alimento fortificado: con la concentración de uno de sus componentes esenciales aumentada (harina fortificada con Fe).
- Alimento que contiene un componente benéfico para la salud que es ausente en materia prima (sal con yodo).
- Alimento en el que un componente natural ha sido sustituido por otro con efectos benéficos (aumento de contenido de grasas insaturadas sobre grasas saturadas).
- Alimento en el que nutriente(s) se encuentran en forma fisicoquímica más biodisponible respecto su forma en materia prima (levadura selenizada).
- Alimentos con aditivos que regulan biodisponibilidad de diferentes especies químicas; se busca aumentar disponibilidad de componentes esenciales y reducir la de los xenobióticos (adición de fibra, microorganismos prebióticos, etc.)
- Alimentos de los que se eliminó uno o varios componentes causantes de un trastorno o enfermedad (leche deslactosada, productos sin gluten).
- Cualquier combinación de las anteriores operaciones.

El déficit de los elementos esenciales (mayoritarios y minoritarios) puede ser revertido mediante la ingesta de alimentos fortificados, por lo que actualmente existe un mercado creciente en el diseño y producción de los mismos [8]. La

biofortificación de plantas comestibles como anteriormente se mencionó representa un sistema atractivo y eficiente para regular la ingesta de estos elementos por los animales y humanos. El desarrollo de fitotecnologías para lograr la biofortificación de plantas comestibles requiere del entendimiento de los procesos de toma, translocación y asimilación de los elementos de interés a niveles, molecular, fisiológico y agronómico [3, 9].

Los alimentos básicos enriquecidos con micronutrientes, ya sea mediante métodos tradicionales de fitomejoramiento o mediante técnicas de biofortificación, representan una solución viable a los problemas de desnutrición, especialmente a la población con escasos recursos [2, 3].

1.1.1 Biofortificación de las plantas

La biofortificación es el proceso de incorporación de cantidades supra-fisiológicas de nutrientes a plantas comestibles durante su crecimiento. La cantidad de micronutriente(s) de interés en las plantas biofortificadas es generalmente difícil de controlar (depende del metabolismo de la planta) y es relativamente menor respecto a los productos fortificados por adición directa; sin embargo la indiscutible ventaja de este proceso es que se asegura una forma del micronutriente biodisponible que en muchos casos presenta actividad biológica benéfica para la salud de consumidores [10].

La biofortificación es la primera herramienta agrícola que se emplea actualmente para abordar la malnutrición de micronutrientes en todo el mundo. La estrategia de biofortificación es un medio factible de llegar a las familias rurales que solo tienen acceso limitado a los mercados y las instalaciones de salud necesarias para proporcionar alimentos enriquecidos y suplementos nutricionales. Una vez implementado, la biofortificación reducirá el número de personas con deficiencia de micronutrientes que requieren intervenciones dependientes de los programas de suplementación y fortificación. Por lo tanto, la biofortificación complementa otras intervenciones existentes en sistemas agrícolas de una manera relativamente rentable y de acuerdo con el principio de sostenibilidad [3].

En general, el éxito de la biofortificación se evalúa bajo los siguientes aspectos:

- Buen rendimiento de cultivos con contenidos altos de micronutrientes de interés sin perjudicar el contenido de otros nutrientes y manteniendo la producción rentable.
- Ingesta de alimentos con base en las plantas comestibles biofortificadas mejora el estatus de micronutrientes en los consumidores.
- Disponibilidad de estos alimentos para el consumo en la población vulnerable [3].

La biofortificación se lleva a cabo por diferentes procesos, incluyendo la intervención agronómica, mejoramiento genético (fitomejoramiento). [11, 12].

Se puede efectuar por fertilización foliar o edáfica con el micronutriente de interés, en donde la aplicación sobre el suelo (edáfica) es la más utilizada [11]. Por otro lado, una opción fiable y simple del crecimiento de plantas es el cultivo hidropónico tratándose de un conjunto de técnicas que permite el cultivo de plantas en un medio libre de suelo, utilizando una solución nutritiva. En este caso, la biofortificación se realiza agregando el fertilizante al medio de cultivo [13].

Con la ayuda de los diferentes procesos de biofortificación, además de lograr la incorporación del(los) micronutriente(s) de interés, el objetivo es inducir en la planta síntesis de metabolitos y nutrientes esenciales que aumenten el valor nutricional de la planta.

Algunos ejemplos de nutrientes que se pretende aumentar con la ayuda de los procesos de biofortificación son aquellos como los aminoácidos, proteínas, vitaminas pero también metabolitos secundarios como aquellos que tienen propiedades antioxidante, por ejemplo flavonoides, terpenos, tocoferoles, cumarinas, ácido fenólicos, carotenoides, esteroides vegetales, etc., [6, 14, 15].

En la biofortificación con micronutrientes minerales, se agrega una forma adecuada del elemento al medio de cultivo esperando su captación y biotransformación por la planta. Un aspecto importante es que, al realizar biofortificación con micronutrientes minerales, se puede lograr al mismo tiempo una modificación de perfil metabólico. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de biofortificación con micronutrientes minerales junto con los efectos sobre el metabolismo de planta que tienen relevancia nutricional.

Tabla 2. Ejemplos de biofortificación de plantas con microelementos y sus efectos de relevancia nutricional en la planta.

Tipo de cultivo	Estrategia de biofortificación	Efectos en planta	Referencia
Berros	Adición de Se(IV) a medio de crecimiento en hidroponía	Biotransformación a Se orgánico, activación de metabolitos secundarios (fenoles), aumento de contenido de algunos elementos esenciales	[16]
Mostaza de la India	Adición de Se(IV) y Cd(II) en hidroponía	Atenuación de los efectos negativos provocados por Cd(II) a través de la regulación de osmoprotectores, enzimas antioxidantes y metabolitos secundarios	[17]
Arroz	Adición de Si y Cd(II) a medio del crecimiento en hidroponía	Atenuación de la toxicidad de Cd(II).	[18]

Lechuga	Adición de Li(I) a medio de crecimiento en hidroponía	Dosis bajas de LiOH, se observa un aumento significativo en la masa fresca de la raíz y con un posible cambio en la concentración de ácido ascórbico	[19]
Girasol y maíz	Adición de Li(I) a medio de crecimiento	En el maíz, se encontró un aumento de la biomasa de brotes y el área foliar en presencia de 5 mg Li L ⁻¹ y un aumento en los niveles de potasio para las plantas de girasol cultivadas en presencia de 50 mg Li L ⁻¹ .	[20]
Lechuga	Adición de Na(I) a medio de crecimiento	Tratamiento con NaCl causó un mejor crecimiento con una capacidad antioxidante superior debido a la biosíntesis mejorada de carotenoides y fenólicos.	[21]

El micronutriente de interés en este trabajo de tesis es el selenio. El problema particular es que la distribución de este elemento en la corteza terrestre no es uniforme; los suelos seleníferos ubicados regiones de China, India y EE. UU., representan riesgo de efectos tóxicos por altas concentraciones de este elemento tanto en plantas como en los potenciales consumidores de estas plantas. Por otra parte, las concentraciones de Se en suelos de otras partes de China, EE. UU., Australia, Nueva Zelanda y Finlandia es particularmente bajo y en estas regiones, la población enfrenta el problema de déficit de selenio.

Dado que bajas concentraciones de formas disponibles de Se en el suelo limitan la ingesta dietética de Se, es muy importante mejorar la biodisponibilidad de Se en suelos o realizar biofortificación aumentando el contenido de Se en productos alimenticios elaborados de plantas, especialmente en áreas con deficiencia de este elemento en suelos [22-24].

1.1.1.1 Biofortificación de las plantas con Se

El selenio (Se) es un micronutriente esencial para los seres humanos que ingresa al metabolismo a través de la dieta, como componente de vegetales, cereales y productos de origen animal (carne y pescado) [25]. Sin embargo, la toxicidad o la esencialidad dependen de la forma química y de la concentración de selenio en estos organismos y en los productos elaborados de ellos [26, 27]. El selenio juega un papel importante como antioxidante, antagonista de metales pesados y en prevención/tratamiento de cáncer [25, 26, 28]. Por esta razón, existe un mercado creciente en el desarrollo de suplementos nutricionales de selenio en los que la levadura selenizada (generalmente *Saccharomyces cerevisiae*) ha sido la más estudiada [25, 29]. En la elaboración de productos alimenticios enriquecidos con Se y suplementos dietéticos de Se, es necesario resaltar la necesidad de conocer su especiación analítica en diversas matrices como suelos, plantas y animales [26]. Varias compañías industriales están ahora involucradas en la producción y comercialización de tales suplementos nutricionales de Se [8].

Los niveles adecuados de ingesta de Se tienen un rango relativamente estrecho entre deficiencia y toxicidad; las estimaciones actuales indican que una ingesta de Se de 30 μg por día es insuficiente para los humanos, mientras que las ingestas superiores a 900 μg por día son potencialmente dañinas. Los niveles de ingesta de Se en la dieta dependen principalmente de la concentración total del elemento en los alimentos consumidos (cultivos, peces y productos animales). En el caso de plantas, el estatus de Se en estos organismos depende de múltiples factores como el contenido de Se y su biodisponibilidad en los suelos y en el agua de riego [22, 24]. La introducción de Se a las plantas comestibles, se puede lograr mediante fertilización de suelos con la adecuada forma de Se, ajustando las condiciones de cultivo, seleccionando especies de plantas que tienden a captar, acumular y biotransformar Se sin presentar efectos tóxicos; así como emplear las herramientas modernas de ingeniería genética mejorando eficacia de biofortificación. El principal objetivo de biofortificación de plantas con selenio es obtener productos dietéticos y/o suplementos dietéticos con formas/especies adecuadas de este elemento presentes en una concentración adecuada.

En la Figura 1, se presenta esquemáticamente el mecanismo de la captación y biotransformación de Se en algunas plantas [22]. Es importante resaltar que en el metabolismo de Se, se están formando especies orgánicas de baja masa molecular, principalmente aminoácidos de selenio no proteicos. Dicha ruta ocurre como un mecanismo defensivo de plantas que previene excesiva incorporación no-específica de Se a las proteínas. Las especies orgánicas de Se son de interés debido a su demostrada actividad biológica en prevención de cáncer.

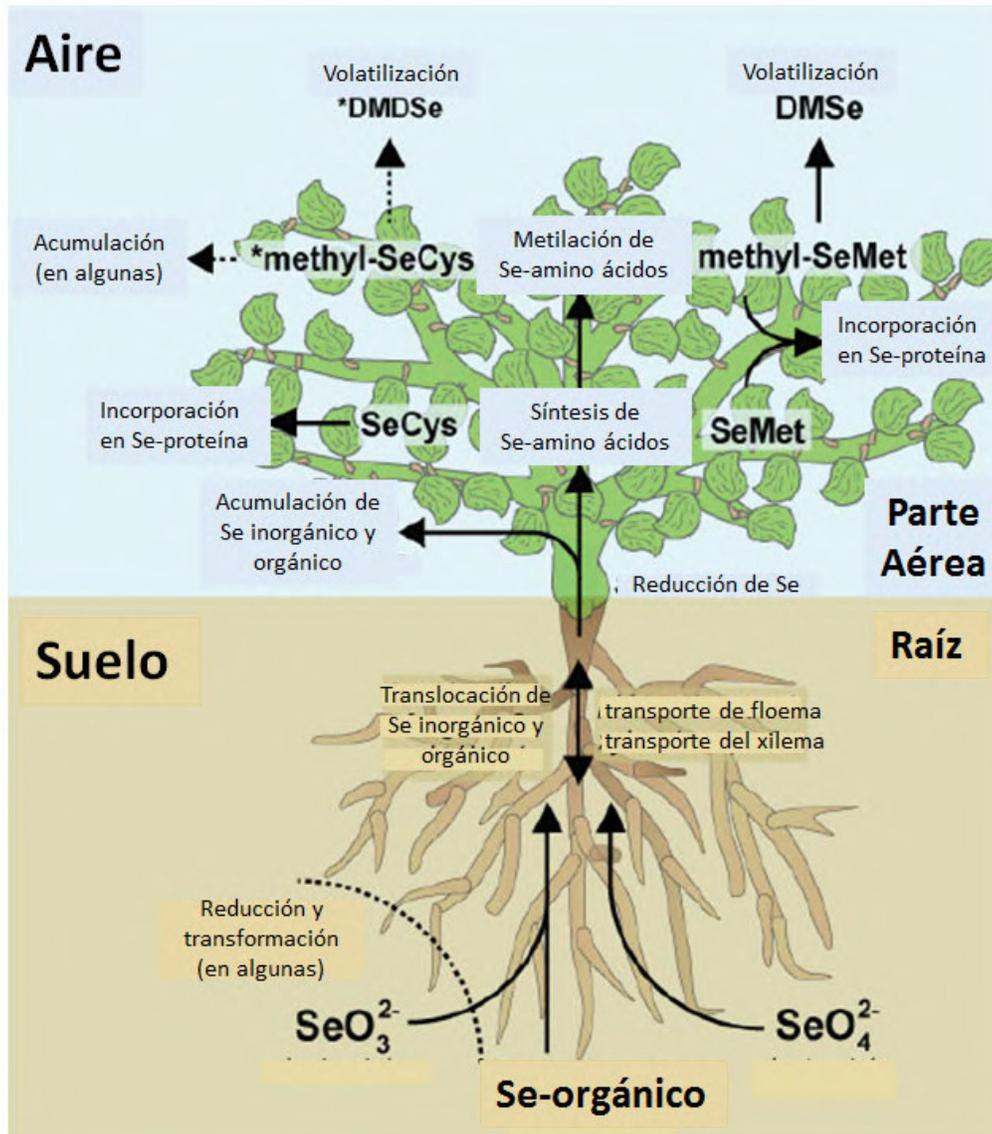


Figura 1. Ruta propuesta de Captación, distribución y biotransformación de Se en plantas superiores. *Abreviaturas: SeCys, selenocisteína; SeMet, selenometionina; methyl-SeCys, metilselenocisteína; methyl-SeMet, metilselenometionina; DMDSe , dimetildiseleniuro; DMSe , dimetilseleniuro [22].

Por otro lado, tal como se mencionó en la sección anterior, las plantas fortificadas con Se pueden ser atractivas nutricionalmente en términos de mayor concentración de minerales esenciales y/o disminución de la captación de elementos pesados y tóxicos [16]. Asimismo, la respuesta defensiva de la planta bajo estrés de Se(IV) puede resultar en activación del metabolismo secundario y presencia de compuestos de carácter antioxidante o nutritivo.

1.2 Suplementos dietéticos de selenio: formas y especies de interés

En la producción de suplementos de Se, el objetivo es asegurar que estos contengan especies orgánicas de Se con actividad biológica demostrada. En la Tabla 3 se hace un breve resumen de suplementos existentes, tanto comerciales como sugeridos con base en investigación.

Tabla 3. Ejemplos de productos suplementados con Se. *Abreviaturas: SeCys, selenocisteína; SeMet, selenometionina; MeSeCys, metilselenocisteína; (SeCys)₂, selenocistina.

Descripción	Forma mayoritaria de selenio	Disponibilidad	Referencia
Levadura selenizada	SeMet	Comercial	[26, 27]
Formulaciones de compuestos químicos y extractos vegetales	Se(IV) y/o SeMet	Comercial (puede contener vitamina E, polifenoles, Zn, etc.	[30, 31]
Ajo fortalecido	SeMet y MeSeCys	Reportes de investigación	[32-34]
Cebolla biofortificada	MeSeCys	Reportes de investigación	[28, 33, 35]
Rábano	(SeCys) ₂ , SeMet y MeSeCys	Reportes de investigación	[33, 36]
Broccoli	MeSeCys	Reportes de investigación	[37]
Indian mustard	SeMet y MeSeCys	Reportes de investigación	[32, 38]
Alfalfa, rábano, acelga y girasol.	SeMet	Investigación	[39]

Para lograr biofortificación de las plantas con Se, es necesario conocer las rutas y mecanismos de su captación en la raíz de diferentes plantas, dependiendo de la forma fisicoquímica del elemento agregada al medio y de su concentración. A continuación se hace una breve descripción de las fuentes de Se, su movilidad en los suelos, biodisponibilidad a las plantas, así como la acumulación y biotransformación mediada por el metabolismo de las plantas [9, 22].

Como se observa en la Tabla 3, típicos suplementos comerciales se elaboran en base a levadura selenizada. En estos productos, aproximadamente 70% del Se total se encuentra en forma de Selenometionina (SeMet) [25, 26]. A pesar de su demostrada actividad anticancerígena, una limitación de SeMet es su capacidad de sustituir metionina (Met) en las proteínas; su acumulación debido al consumo prolongado de suplementos puede llevar a efectos adversos mediante cambio de estructura y funcionalidad de algunas proteínas [25, 28]. Una alternativa a la levadura selenizada es el enriquecimiento de ciertas verduras y plantas con selenio y en este sentido teniendo en cuenta la capacidad de algunas plantas para acumular y biotransformar el selenio en compuestos bioactivos, se deduce que el uso de especies de plantas enriquecidas o selenizadas puede tener importantes

beneficios en la nutrición y la salud humana. Las formas primarias de Se encontradas en vegetales enriquecidos con selenio de la familia *Allium* (ajo y cebolla) son metilselenocisteína (MeSeCys) y algunos de sus derivados como γ -glutamil-Se-metil-selenocisteína [28]. También se ha informado que Se-aminoácidos no proteicos están presentes en las plantas acumuladoras de Se de los géneros *Brassica* y *Astragalus*. En particular, metilselenocisteína ha sido ampliamente estudiada como un compuesto anticancerígeno [25, 28, 40, 41].

De manera general entonces, las especies orgánicas de selenio producidas por algunas plantas son preferidas en suplementación debido a su actividad biológica, carácter menos pro-oxidante respecto a las especies inorgánicas y su no acumulación en los tejidos (tal como ocurre en el caso de SeMet presente en levadura). Las verduras de interés en la biofortificación con selenio son las de la familia *Allium* (ajo y cebolla) y de la familia *Brassicaceae* (brócoli y mostaza india) [8, 27].

Por otro lado, una limitación de plantas como potenciales suplementos comercializados es relativamente baja estabilidad de aminoácidos no proteicos de Se. Es por ello que los suplementos en base de plantas deberían venderse y ser consumidos frescos. En este trabajo de tesis, se propone explorar la factibilidad de obtener germinados de plantas comestibles, biofortificados con Se.

1.3 Ventajas de biofortificación de germinados

En el contexto de los conocimientos actuales sobre captación y metabolismo de Se en plantas, parece interesante explorar la biofortificación de los germinados de plantas comestibles. Estos productos se venden frescos y se consumen generalmente crudos, lo que debería asegurar la presencia de las especies orgánicas de Se con actividad biológica. Aunado a esto, los germinados tienen alto valor nutricional debido al elevado contenido de carbohidratos, proteínas, isoflavonas, vitaminas, minerales, enzimas y ácido fólico; en particular, los brotes de alfalfa, soja y lenteja son buenas fuentes de isoflavonas, ya que exhiben una variedad de actividades biológicas que pueden influir en el riesgo de diferentes enfermedades [34, 42, 43]. De esta manera, podría esperarse que los germinados biofortificados con Se cumplan con varios aspectos de alimentos funcionales. Así las ventajas esperadas serían corto tiempo de su obtención, alto valor nutritivo, consumo del material fresco y crudo (asegurando la ingesta de las formas adecuadas del Se) ya que la cocción podría afectar la especiación de Se.

Durante el proceso de germinación ocurren un conjunto de cambios que se producen en la semilla por el cual el embrión pasa de la vida latente a la vida activa, para que se desarrolle una nueva planta. La reserva nutritiva en todos los granos y semillas consiste en proteínas, carbohidratos, vitaminas y sales

minerales. Desde el punto de vista nutricional, estos componentes son requeridos por nuestro organismo para su correcto mantenimiento y desarrollo [44, 45]. Al poner las semillas en contacto con agua, calor y oxígeno, se activan las enzimas llamadas diastasas, dando lugar a las siguientes transformaciones:

1. Mediante la absorción de agua la semilla duplica su volumen y se rompe la cáscara protectora.

2. Las enzimas se activan y provocan una serie de transformaciones:

- Las proteínas complejas se transforman en aminoácidos simples, algunos de los cuales son imprescindibles para el desarrollo de la planta, pero también para el ser humano.
- El contenido proteico de la semilla queda presente en el germinado, de forma fácilmente asimilable.
- El almidón se degrada a maltosa y dextrina, azúcares más simples que exigen menos esfuerzo al aparato digestivo, liberan energía más rápido y producen un efecto estimulante.
- Se sintetizan abundantes vitaminas y fermentos.
- Cuando una semilla germina, sus minerales son quelados o se enlazan a las proteínas, lo que aumenta su función.
- Las grasas se transforman en ácidos grasos.
- Se forma la clorofila, la cual es necesaria para la fotosíntesis en plantas.
- Los ácidos y las toxinas que de forma natural acompañan a la semilla para su defensa se descomponen.
- El volumen y el contenido de agua pasa de ser de un 5-12% en la semilla a un 70% en el germinado.

Los germinados consumidos por ejemplo alfalfa, berro, garbanzos, lentejas, maíz, mostaza, semillas de girasol y trigo destacan por su valor nutritivo de nutrientes esenciales tales como:

- Vitaminas: En general, los germinados contienen cantidades considerables de vitaminas, sobre todo vitamina C y vitaminas del grupo B
- Minerales: Aunque difieren dependiendo del tipo de semilla, suelen contener calcio, magnesio, hierro, zinc y otros minerales y oligoelementos.
- Enzimas: Los germinados poseen una gran riqueza de enzimas que facilitan la digestión de otros alimentos ricos en proteínas o grasas.
- Clorofila: Los germinados son extraordinariamente ricos en clorofila, estructuralmente muy similar a la hemoglobina, como ella, lleva oxígeno a las células y es un buen agente desintoxicante y regenerador del

organismo. Por lo tanto juegan un papel importante en el control de la anemia y el aumento de defensas.

- Pocas calorías.

Se han reportado muchos estudios sobre la especiación del Se en las plantas en relación con vegetales como la soya, la mostaza india, el rábano, la cebolla, el ajo, el brócoli o la col rizada [8, 34]. Aunque los resultados han sido alentadores, la biofortificación de los cultivos tradicionales requiere fertilización de suelos con selenito o selenato, lo que significa un alto costo y además, puede conducir a la contaminación ambiental. Contrario a eso, los brotes o germinados se obtienen en sistemas hidropónicos cerrados. Sin embargo, la literatura sobre biofortificación de brotes con Se es bastante limitada. En algunos estudios realizados anteriormente en germinados de alfalfa, girasol, trigo y soja, se ha reportado la presencia de SeMet, SeMeCys, (SeCys)₂, SeCys, γ -glutamil-Se-metil-selenocisteína así como compuestos de selenio no identificados [8, 34, 42, 43].

Por otro lado, estudios realizados sugieren la importancia de los brotes de alfalfa (*Medicago sativa* germinado de interés para este trabajo) para una dieta saludable ya que contienen aproximadamente 3,78% de carbohidratos, 3,99% de proteínas y 0,69% de lípidos totales (grasas), y el resto consiste en minerales y vitaminas. Los brotes comestibles de alfalfa son una buena fuente de vitaminas A, B1, B2, B6 y C y ácido fólico, así como muchos elementos minerales, por ejemplo, Fe, P, Zn, Mg y Ca. Además, se ha demostrado que la planta alfalfa tiene capacidad de acumular selenio y convertir eficazmente el selenio inorgánico en orgánico [8]. Así mismo, se ha reportado para alfalfa que los brotes obtenidos de su germinación en presencia de selenio poseen mayor cantidad de selenio en biomasa que cuando las plantas se desarrollan completamente y después son expuestas a este elemento [8], lo que puede sugerir cambios en la asimilación de Se y en las propiedades nutricionales dependiendo del método de suplementación y del estado de desarrollo de la planta. Para los brotes de girasol se ha demostrado que son resistentes y presentan tasas de captación altas de Se (hasta 900 mg kg⁻¹); sin embargo, los análisis revelaron la prevalencia de Se inorgánico no-metabolizado. El trigo por su parte es menos resistente a Se y su capacidad de acumulación llega hasta 100-150 mg Se kg⁻¹ de masa seca [42]. Un importante antecedente de este trabajo de tesis es el estudio realizado en cuatro especies de plantas de consumo común en México (rábano, girasol, alfalfa, y acelga), las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de selenito de sodio (tesis de licenciatura).

Con base en los resultados obtenidos, se propone enfocar el trabajo en germinados de alfalfa debido a que esta planta presenta relativamente corto tiempo de germinación, alto rendimiento en la producción de biomasa sin

inhibición del crecimiento hasta concentraciones de 10 mg de Se L⁻¹ en el medio, acumulación de selenio total en biomasa hasta 75 µg g⁻¹ (después de 10 días de exposición) capacidad de biotransformación de Se inorgánico con aprox. 66% de selenio total el planta en esta forma y efecto de Se sobre el incremento de la absorción de elementos esenciales como Cu, Mn, Mo, Ca y K.

Con base en esta revisión que se acaba de presentar, queda claro e interés en profundizar en el conocimiento de la viabilidad del uso de germinados en procesos de biofortificación con selenio, así como evaluación de la calidad nutricional de los mismos. El presente estudio está dirigido entonces a la evaluación de germinados de plantas comestibles en cuanto a su capacidad de acumular/biotransformar el selenio inorgánico y de su efecto sobre el valor nutricional de germinados. Todos ellos cultivados en medios enriquecidas con Se(IV). En particular, se dará una atención especial a la identificación de seleno compuestos presentes en los brotes, en el análisis de otros metales/metaloideos y en el análisis de metabolitos de relevancia nutricional.

1.4 Tareas analíticas y herramientas utilizadas en estudios de biofortificación con selenio

Para conocer el alcance y la eficacia del procedimiento de biofortificación utilizado, se pueden planear los siguientes tipos de análisis:

1. Determinación de Se total en diferentes partes morfológicas de la planta y evaluación del factor de captación
2. Caracterización y cuantificación de especies de selenio.
3. Análisis de metabolitos de interés para evaluar el impacto de Se sobre valor nutricional de la planta fortalecida.

Los resultados obtenidos de este tipo de análisis permiten contribuir en la elucidación de mecanismos responsables de los procesos de captación, transporte, distribución, acumulación y biotransformación de selenio en sistemas vegetales así como la evaluación de su potencial en la síntesis de compuestos biológicamente activos [46-50].

Para obtener el perfil ionómico, así como conocer la captación de Se en biomasa, las herramientas analíticas indicadas abarcan diferentes tipos de espectrometrías atómicas entre las cuales la más potente es sin duda la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Por otro lado, si no es requerido el alto poder de detección, una interesante alternativa es espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (MP-AES), especialmente para la cuantificación de hetero-elementos mayoritarios.

Para estudios de especiación de selenio, se pueden utilizar diferentes técnicas analíticas híbridas que acoplan la separación cromatografía con espectrometría de masas atómica y/o molecular (HPLC-ICP-MS, HPLC-ESI-MS y MS/MS) [8, 34, 42, 43], siendo la etapa de pretratamiento de muestra crucial desde el punto de vista de información analítica que se obtiene.

En cuanto a la evaluación de la calidad nutricional de germinados cultivados en presencia de Se(IV), el actual estado de arte ofrece un amplio abanico de procedimientos y técnicas, muchos de ellos basados en procedimientos de fraccionamiento/tratamiento de muestra existentes en el área de ciencias ómicas y en el uso de espectrometría de masas [51-54].

Cabe señalar que muchos de los sistemas antes mencionados, tales como cromatografía de líquidos o de gases en acoplamiento con detectores másicos de alta y de baja resolución han sido utilizados en estudios anteriores para estudiar el metabolismo de selenio en organismos vivos [55-60].

1.5 Determinación de concentraciones totales de Se y de otros elementos en material de plantas

La determinación de Se total permite evaluar la captación y distribución de selenio en partes morfológicas de la planta. Si este análisis se realiza para un mayor número de elementos presentes en la planta, se obtiene el perfil ionómico. Como ya se ha mencionado en la sección anterior, las técnicas ICP-MS y MP-AES son las indicadas, pero es necesario mencionar la necesidad de una digestión previa la que típicamente se realiza con el ácido nítrico y agua oxigenada.

1.5.1 Espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES)

Una de las técnicas de espectrometría atómica muy utilizada es la espectrometría de emisión atómica (AES), la cual se fundamenta en excitación térmica de átomos en estado gaseoso y uso de espectros lineales emitidos durante el proceso de relajación. Dichos espectros son específicos de cada elemento y la selección de una línea por medio de un monocromador nos permite confirmar identidad del elemento y determinar su concentración [61, 62]. El funcionamiento de esta técnica consiste en la introducción de la muestra, atomización, excitación y un sistema óptico para adquirir los espectros de emisión. Para la cuantificación de cierto elemento se mide la intensidad de emisión en una línea, típicamente la más intensa en el espectro. La fuente de atomización y excitación es un plasma que se caracteriza por alta temperatura, buena estabilidad, baja reactividad y baja susceptibilidad a la presencia de sales y de materia orgánica presentes en la muestra. La fuente de plasma más utilizada es el plasma de acoplamiento

inductivamente (ICP), que es generado por argón que debe ser ionizado y sostenido en estado de plasma por un campo electromagnético de alta frecuencia [63]. Existe también el plasma sostenido por microondas (MIP) que utiliza nitrógeno en vez de argón disminuyendo drásticamente los costos de operación.

La introducción de la muestra en el MP-AES se lleva a cabo con la ayuda de una bomba peristáltica que forma parte del equipo, en la cual existen 5 posiciones para conectar por medio de tubos y dirigir la muestra al plasma a través de un nebulizador y una cámara de nebulización, las cuales varían en diseño dependiendo del tipo de análisis que se requiera hacer [64]. El MP-AES funciona mediante un plasma estable que es sustentado por energía de microondas. Para formar el plasma, el equipo cuenta con un alimentador de corriente de alto voltaje de estado sólido con una potencia fija de 1 kW, y de un magnetrón de 2.45 GHz que son utilizados para generar un campo magnético y un campo eléctrico. Una guía de microondas concentra este campo magnético axial y el campo eléctrico alrededor de la antorcha, enfocando la energía de microondas en esta zona para la generación del plasma y su sostenimiento. Un generador de nitrógeno alimenta el plasma de microondas evitando el uso de fuentes adicionales de gas [64]; el equipo posee un sistema pre-óptico que enfoca la radiación emitida por los átomos excitados del plasma, para permitir su observación axial y un monocromador, con 600 mm de longitud focal y una rendija de difracción holográfica con 2 400 líneas mm^{-1} , cubriendo el intervalo de las longitudes de onda de 178 nm a 780 nm [64]; el detector de tipo dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) en estado sólido sensible a longitudes en la región UV, el cual está diseñado especialmente para detección de bajas intensidades de radiación con >90 % de eficiencia cuántica de sensibilidad de pico; el arreglo del detector CCD almacena el espectro del (los) analito(s) y el fondo espectral vecino, permitiendo una corrección simultánea del fondo para mejorar la estabilidad y precisión [64].

1.5.2 Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma inductivamente es conocida como ICP-MS. Es una técnica poderosa para determinaciones de elementos traza. La muestra es introducida por nebulización neumática a través de la cámara de rocío al plasma. El aerosol de la muestra es llevado al canal central del plasma de argón donde la muestra es atomizada e ionizada para producir una nube de iones cargados positivamente [65]. Los iones son extraídos, filtrados en un cuadrupolo, detectados y cuantificados. En el análisis multielemental, el cuadrupolo escanea el intervalo de masas seleccionado, filtrando los iones de interés para su detección/conteo con base en la relación de su masa sobre su carga (m/z) [63, 65]. Típicamente, la cuantificación se basa en el proceso de calibración externa.

ICP-MS destaca por límites de detección extremadamente bajos, un amplio rango dinámico lineal, capacidad de medir isótopos de los elementos y por falta de interferencias químicas. Los límites de detección muy bajos se deben al alta eficacia de ionización en el plasma de argón a aproximadamente 6000 a 10000 K [65]. Cuando se usa un espectrómetro de masas con un cuadrupolo, hay problemas causados por la interferencia espectral, por ejemplo, cuando se mide ^{80}Se (isótopo Se más abundante), la masa/carga 80 experimentará interferencia del Ar dímero $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ [65, 66]. Por lo tanto la técnica ICP-MS no es libre de interferencias, siendo las más importantes las interferencias espectrales poliatómicas, mismas que pueden ser eliminadas mediante el uso de la celda de colisión/reacción [65, 67]. El uso de estándar interno compensa las interferencias físicas causadas por cambios de viscosidad de la muestra, cambios en eficacia del transporte, fluctuación del plasma, entre otras. .

1.6 Fraccionamiento/especiación de selenio

La parte crucial para lograr una buena confiabilidad de resultados en el análisis de especiación es elegir un protocolo adecuado de tratamiento de muestra que permita la separación de formas/especies de interés, evitando al mismo tiempo posibles pérdidas, contaminaciones o inter-conversiones de especies; el fraccionamiento consiste en la separación o extracción de aquellas formas del elemento que existen en la muestra y que presentan propiedades fisicoquímicas similares tales como polaridad, carga iónica, tamaño de molécula, solubilidad en solventes orgánicos, etc.; este procedimiento se realiza como un tratamiento inicial de muestra ya que permite eliminar buena parte de la matriz de muestra seguido por un protocolo de mayor selectividad enfocado en la detección/identificación y cuantificación de especies individuales. El diseño de las etapas de fraccionamiento y de especiación obviamente depende de la información analítica que se pretende obtener. En el caso de análisis de material de plantas biofortificadas con selenio, se han utilizado diferentes esquemas de tratamiento de muestra. En la Tabla 4, se presenta un breve resumen de estudios reportados en bibliografía sobre este tópico. Cabe resaltar, que en la etapa de especiación se han utilizado principalmente las técnicas híbridas en las cuales la separación cromatográfica está acoplada en línea a un espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente en el caso de determinación de especies conocidas, mientras que en estudios explorativos se utiliza espectrometría de masas molecular debido a su capacidad de caracterización estructural (identificación) de los compuestos.

Tabla 4. Trabajos representativos de fraccionamiento/especiación de selenio

Planta	Descripción	Especies de Selenio	Técnica	Referencia
--------	-------------	---------------------	---------	------------

Alfalfa	Homogenización: <ul style="list-style-type: none"> • Agua desionizada • Baño ultrasónico • Centrifugación • Separación de fracciones 			[8]
	Fración de sobrenadante <ul style="list-style-type: none"> • SEC con colección de fracciones • cromatografía de intercambio iónico o de fase inversa con colección de fracciones • Espectrometría de masas molecular para identificación 	SeMet y MeSeCys	HPLC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	
	Facción de pastilla <ul style="list-style-type: none"> • Digestión acida • Determinación de Se 	Se total	ICP-MS	
Berros	Fracionamiento celular <ul style="list-style-type: none"> • Homogenización <ul style="list-style-type: none"> ○ Biomasa fresca ○ Adición de MeCN:Agua ○ Centrifugación • Separación de fases sobrenadante 1 y pastilla 1 		ICP-MS	[68]
	Sobrenadante 1 <ul style="list-style-type: none"> • Compuestos polares y baja masa molecular Pastilla 1 <ul style="list-style-type: none"> • Tris-HCl • Ultrasonido • Centrifugación • Separación de fases sobrenadante 2 y pastilla 2 	Se y Cd total		
	Sobrenadante 2 <ul style="list-style-type: none"> • Fracción rica en proteínas Pastilla 2 <ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos, lípidos y membranas celulares 	Se y Cd total		
Hojas de cebolla	Extracción <ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de sodio para la solubilización de proteínas • Centrifugación • Se analiza el sobrenadante 	Compuestos de alto peso molecular	SEC-ICP-MS	[28]
	Extracción <ul style="list-style-type: none"> • Mezcla metanol: cloroformo: agua (12: 5: 3) • Se evapora • se añade cloroformo y agua. La fase acuosa se evapora • se disuelve en agua 	MeSeCys	RP-IP-HPLC-ICP-MS	
Cebolla verde	Extracción <ul style="list-style-type: none"> • Se adiciona HCl a la muestra • La mezcla se agita • Se filtra usando un filtro PVDF 0.45 µm • La solución resultante se inyecta en el sistema • El residuo se disuelve en metanol para MS 	Se(IV) y Se(VI), SeMet, SeCys	RP-IP-HPLC-ICP-MS, ESI-ITMS	[69]
kale	Homogenización: <ul style="list-style-type: none"> • A la muestra, se añade HCl 0.1 M y 			[70]

	metanol <ul style="list-style-type: none"> • Se sónica en un baño de ultrasonidos • Se centrifuga 			
	Fracción de sobrenadante <ul style="list-style-type: none"> • Se diluye con una fase móvil • La mezcla se filtra en un filtro de 0.45 µm. • Se inyecta en el sistema 	Selenio inorgánico, SeMet y MeSeCys	HPLC-ICP-MS	
Ajo, rábano y girasol	Extracción <ul style="list-style-type: none"> • Extracción con agua con adición de lipasa y proteasa por agitación magnética • Centrifugación recuperando sobrenadante 			[34]
	Sobrenadante <ul style="list-style-type: none"> • Se filtran a través de una membrana. • Los extractos se guardan a -15 ° C antes de la separación cromatografía • Se separan fracciones respecto al tiempo de retención 	SeMet, MeSeCys y γ-glutamil-Se-metilselenocisteína	HPLC-ICP-MS	
	Fracciones del sobrenadante <ul style="list-style-type: none"> • Las fracciones recogidas de sobrenadante se concentran en una centrifuga al vacío hasta la sequedad y se resuspenden en ácido fórmico acuoso 	SeMet, MeSeCys y γ-glutamil-Se-metilselenocisteína	HPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS	

1.7 Análisis de metabolitos de interés en nutrición

En mayoría de los casos se trata de estudios explorativos, sin conocer identidad de los compuestos. Por ello, en primer lugar, se utilizan procedimientos típicos de metabolómica no dirigida (untargeted), la cual consiste en 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., lo que permite comparar plantas biofortificadas respecto controles, crecidos sin Se. En la etapa siguiente, se trata de conocer la identidad de los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en plantas biofortificadas y que pueden tener una importancia nutricional; para lo cual, es necesario implementar procedimientos analíticos adecuados para la determinación de compuestos de interés tales como fenoles, aminoácidos, lípidos, etc. (un resumen de dichos procedimientos se presenta en la Tabla 5); la información obtenida a partir del uso de estas herramientas analíticas podría contribuir en la evaluación del impacto de biofortificación con Se sobre el valor nutritivo de la planta. Por otro lado, la preparación de muestra es una etapa crucial y depende del análisis a realizar y de la técnica analítica a utilizar; para el caso los estudios de metabolómica untargeted en los protocolos de extracción descritos el objetivo es de extraer una gran variedad y cantidad de metabolitos, sin embargo, este proceso se puede realizar con una mayor especificidad, seleccionando así el(los) grupo(s) de compuestos y condiciones de extracción.

Tabla 5. Trabajos representativos de algunos metabolitos de interés

Tipo de muestra	Descripción	Metabolito	Técnica	Referencia
Berros	La muestra liofilizada. Se homogeniza con metanol al 70% y se centrifuga.	Compuestos fenólicos	GC-FID HPLC– DAD/FLD	[71]
	El sedimento se resuspende en metanol al 90%, se mezcla con vórtex y se centrifuga.			
	Los dos sobrenadantes se combinan y se evaporan. Luego, se añade ácido tricloroacético al 5%, posterior extracción con acetato de etilo:ciclohexano (1: 1). Las fases orgánicas obtenidas se evaporan a sequedad.			
Alimentos derivados de plantas	Extracción e hidrólisis: Muestra seca homogenizada en MeOH:H ₂ O (62.5% MeOH) con adición de BHA.	Flavonoides	HPLC- DAD	[72]
	Se sónica y se añade HCl 6M. La muestra se burbuja con N ₂ y se lleva a cabo un baño de agua a 90 °C.			
	Posteriormente, la muestra se enfría, luego se extrae con metanol y se sometió a ultrasonido.			
lechuga	La muestra se homogeniza en HPO ₃ 5% (p/v) frío, y se centrifuga. El sobrenadante se incuba a 25 °C en oscuridad con una mezcla de reacción formada por KH ₂ PO ₄ , y de DTT.	ascorbato total	Espectrofotómetro UV-VIS	[73]
	Se añade 0.5% (w/v) de n-etilmaleimida, 10% (p/v) de ácido tricloroacético, ácido o-fosforico, 2,2'-Bipiridina en etanol al 70%, y 110 mM de FeCl ₃ .			
Hojas de Lechuga	Las hojas congeladas homogenizadas con N ₂ líquido se extraen en hexano-acetona-etanol, y el extracto se mezcla y se centrifugaron.	Carotenoides	HPLC equipado con PDA	[74]
	El sobrenadante se seca, y se resuspende en KOH y MeOH al 80%, después se deja a temperatura ambiente y se agrega H ₂ O y éter para saponificar y repartir los triacilglicéridos en la fase acuosa.			
	Los extractos de éter se secan a temperatura ambiente bajo una corriente de N ₂ , se resuspenden en CH ₃ CN-MeCl ₂ -MeOH con adición de BHA hidroxitolueno butilado al 0.5% (p / v).			
Solución estándar	En cada solución, se añade hidróxido sódico 0.33 M, seguido por 23% (v/v) de picolina en n-propanol y por ultimo de adición de derivatizante (n-propilo cloroformato) en una solución de cloroformo.	Amino ácidos	(RP) HPLC- QTOF- MS/MS	[75]
Semillas germinadas de maíz	Extracción de proteínas: A la muestra se agrega un solvente de extracción que contiene Tris-Base 0.05 M; ácido cítrico monohidratado 7 mM; hidrocloreuro de cisteína 0.1%; ácido ascórbico 0.1% y glicerol 1%.	Proteínas totales	Espectrofotómetro UV/VIS	[76]
	Baño de ultrasonido a 35 °C. Se separa el sobrenadante y la extracción se realiza dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se combinan y se centrifugan.			

Con base en los antecedentes y la revisión de le estado arte, este trabajo de tesis no solo se enfocó en la determinación de especies de selenio en particular metilselenocisteína, sino que también se pretendió evaluar la calidad nutricional de los germinados mediante la realización de estudios metabolómicos.

2 CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la calidad nutricional de germinados obtenidos de medios adicionados con Se(IV), mediante el desarrollo/implementación de procedimientos analíticos concernientes a las áreas de investigación emergente ionómica, metalómica y metabolómica.

2.1.1 Objetivos particulares

- Evaluar el perfil ionómico de los germinados obtenidos, así como la captación de Se en biomasa mediante el uso de técnicas de espectrometría atómica (ICP-MS y MP-AES).
- Desarrollar/implementar procedimientos analíticos para determinar Se-compuestos mediante el uso de técnicas híbridas de espectrometría atómica y molecular como HPLC-ICP-MS, HPLC-ESI-QTOFMS y HPLC-ESI-ITMS.
- Evaluar la calidad nutricional de los germinados biofortificados con Se(IV), realizando estudio metabolómicos de metabolómica no dirigida.

3 CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipo de laboratorio

3.1.1 Equipos utilizados en procesamiento de muestra y preparación de reactivos

- pH metro 3200P Agilent Technologies.
- AccuBlock Digital Dry Baths D1200 Labnet.
- Balanza de precisión ME303 Mettler Toledo.
- Unidad de purificación de agua para laboratorio WaterPro PS series.
- Purificador de agua destilada Martes Flex/Cole Parmer Instrument Co. Modelo 60648.
- Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS.
- Liofilizador modelo 10-269 de Labconco y frasco Fast-Freeze 600 mL Labconco.
- Centrifuga Gusto high speed mini centrifuge.

3.1.2 Instrumentación analítica

- Espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas, (MP-AES 4100, Agilent Technologies).
- Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (7500ce ICP-MS, Agilent Technologies).
- Cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000(Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, desgasificador, compartimiento con termostato para columna y un automuestreador.
 - Columna Phenomenex Luna C18 (15 x 2 mm, tamaño de partícula 3 μm) con la pre-columna (4 x 2 mm) (Phenomenex).
- Espectrómetro de masas con trampa iónica Amazon SL equipado con una fuente de ionización por electro nebulización (ESI-ITMS, Bruker Daltonics).
- Espectrómetro de masas de alta resolución maxis Impact: ionización ESI y analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (ESI-QTOF-MS, Bruker Daltonics).
- Cromatógrafo de gases con detector de masas de triple cuadrupolo. Modelo Bruker Scion TM, GC-MSTQ.

3.2 Reactivos y estándares

3.2.1 Reactivos para medio de crecimiento y exposición a Se

- Selenito de sodio
- Sales utilizadas para la preparación del medio de crecimiento Hoagland: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KNO_3 , H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.2.2 Reactivos para digestión ácida

- Reactivos utilizados para tratamiento de muestra: HNO_3 concentrado, H_2O_2 .

3.2.3 Estándares para determinación de contenido total de Se, elementos traza, elementos mayoritarios y especiación de Se.

- Estándar multielemental para muestras medioambientales de Agilent Technologies (100 mg L^{-1} Fe, K, Ca, Na, Mg; 10 mg L^{-1} Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, V, Zn, U en 10% HNO_3).
- Solución multielemental de estándares internos indio In, Y, Bi y Rh (2.0 mg L^{-1}), Li (10 mg L^{-1}) y Sc (5.0 mg L^{-1}).
- Estándares individuales de Zn, Mg, Na, Fe, K y Ca (1000 mg L^{-1}) de Sigma-Aldrich.
- Material de referencia NIST 1572 Citrus Leaves.
- Selenometionina (SeMet), Metilselenocisteína (MeSeCys), Selenocistina ((SeCys)₂), Selenocisteína SeCys. Metionina (Met), Cisteína Cys, Cistina (Cys₂) de Sigma-Aldrich.
- Ácido metanosulfónico.

3.2.4 Reactivos para las reacciones de derivatización

- Piridina, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, 1-propanol, iso-octano y propil cloroformato.
- N,O-bis(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida (BSTFA).

3.2.5 Disolventes

- Cloroformo, metanol, acetonitrilo.

3.3 Semillas empleadas

Las semillas empleadas fueron adquiridas en tiendas especializadas de jardinería,

- Alfalfa (*Medicago sativa*).

3.4 Software

- Unscrambler 7.5 (Camo, Norway).
- Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics)
- QuantAnalysis (Bruker Daltonics)
- Software AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System) versión 2.70 para tratamiento de datos obtenidos de espectrometría de masas.
- Programa GRAMS/ 386 TM, Version 3.01 A
- MS Data Review Versión 8.2MS WorkStation, Method Builder versión 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- MS WorkStation, MS Data Review version 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- ChemDraw Ultra 12.0, para modelar moléculas químicas.

3.4.1 Tratamiento de semillas previo a la germinación

Con base en los antecedentes descritos en la Introducción, para la realización de este proyecto de tesis se seleccionó como modelo de estudio a la especie

Medicago sativa (alfalfa). Las semillas fueron adquiridas en mercados especializados; previo a la siembra fueron lavadas con 70% de etanol durante 3 min, después con solución de hipoclorito de sodio 3.1% durante 10 min, por último, se enjuagaron con agua desionizada para eliminar posibles fuentes de contaminación.

3.4.2 Evaluación de condiciones de crecimiento

La germinación crecimiento y exposición de los brotes se llevaron a cabo en sistema hidropónico. La cantidad de semillas utilizadas para la obtención de germinados de alfalfa fueron 1.5 g por cada 100 mL de medio de crecimiento. Para la germinación se utilizó como medio de crecimiento la solución nutritiva Hoagland (modificada) pH 5.8, a diferentes concentraciones de Se(IV) 0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg Se L⁻¹, el periodo de germinación y crecimiento fue de 10 días. La composición del medio de crecimiento se muestra en la Tabla 6. El proceso de germinación comenzó con 48 hrs de oscuridad hasta el brote de las radículas, posteriormente las condiciones de crecimiento fueron fotoperiodos de 16 h luz/8 h oscuridad, humedad relativa 50% y temperatura de 25 °C esto fue realizado en una cámara de crecimiento.

Tabla 6. Composición del medio de crecimiento Hoagland.

Compuesto	Concentración
Ca(NO ₃) ₂	0.35 mM
KNO ₃	0.255 mM
MgCl ₂	0.91 mM
MoO ₃	23.13 µM
MnCl ₂	3.9 µM
Zn(NO ₃) ₂	0.37 µM
Fe(NO ₃) ₂	10 µM
CuSO ₄	0.44 µM
H ₃ BO ₃	32.13 µM
KH ₂ PO ₄	0.97 mM
CaCl ₂	2.1 mM

3.5 Tratamiento de muestra

Al término del periodo de exposición, las plantas fueron lavadas con CaCl₂ 0.05 M y agua desionizada. La biomasa obtenida fue liofilizada y homogeneizada para su preservación y posterior análisis.

4 CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Antecedentes

Con base en los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en el grupo de investigación (Tesis de Licenciatura), se seleccionó a la alfalfa (*Medicago*

sativa) como modelo de estudio para el desarrollo de este proyecto; debido a su rápida germinación, fácil accesibilidad a las semillas, crecimiento en sistemas hidropónicos, periodos cortos de germinación, más del 70% de conversión de selenio inorgánico (iSe) a selenio orgánico (oSe), tolerancia a soportar concentraciones de hasta 10 mg Se L⁻¹ en medio y aumento en la captación de elementos esenciales como Cu, Mn, Mo, Ca y K cuando la planta es expuesta a bajas concentraciones de Se; sin olvidar su contenido nutricional, ya que *Medicago sativa* es una de las plantas utilizadas para forraje más cultivada en el mundo, posee alto contenido de proteína (2000-3000 kg/ha) tres veces más que la soya y 4 veces más que el trigo, es una fuente importante de metabolitos secundarios utilizados en la industria farmacéutica y la agricultura tales como saponinas, sapogeninas, flavonoides, ciclitoles y compuestos fenólicos [8, 77][78]. El heno de alfalfa es muy nutritivo y aceptable para el ganado, ya que contiene alrededor de 16% de proteínas y 8% de constituyentes minerales; también es rica en vitaminas A, E, D y K. Cuando se siembra como un cultivo de cobertura o como parte de una rotación de cultivos, esta especie mejora los niveles de nutrientes del suelo y disminuye la necesidad de fertilizantes sintéticos [8, 79]. Por otro lado, dentro de los estudios realizados por ICP-MS para esta planta, se encontró la presencia de especies de selenio como Selenometionina y metilselenocisteína en los extractos acuosos junto con otras especies desconocidas que contienen Se; por otro lado, estudios realizados por ESI-Q-TOF permitieron sugerir la presencia de Se-2-propenil selenocisteína [8].

En la actualidad, aunque el estudio de selenio en plantas es basto, investigaciones dirigidas a la evaluación de la calidad nutricional de germinados enriquecidos con este elemento son muy limitadas; por lo que, en este proyecto de tesis se estableció como supuesto de investigación el estudio analítico del proceso de suplementación de Se en germinados de alfalfa desde los enfoques iónico, metalómico y metabolómico; para lo cual, fue necesario el desarrollo/implementación de procedimientos analíticos acordes a las áreas de investigación mencionadas.

Considerando que las muestras biológicas (dentro de las que se incluyen las plantas) son matrices químicamente complejas y que los objetivos de estudio son diversos, se propuso un esquema general de tratamiento de muestra con varias etapas de fraccionamiento acordes a los propósitos y áreas de investigación, esto con el fin de realizar la mayor extracción de analitos posible, eliminar interferentes de matriz, evitar posibles pérdidas y contaminaciones. El diseño de este esquema se llevó a cabo considerando: I) la determinación del contenido total de Se y elementos esenciales (traza y mayoritarios) en biomasa; y II) la determinación de compuestos de selenio libres (de baja masa molecular). Aunque dentro de los

objetivos de estudio se encontraban la realización de análisis metabólicos, este requiere un tratamiento de muestra diferente.

4.2 Obtención de germinados de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de Se(IV)

Al término de periodo de crecimiento y exposición a selenio, se determinó la cantidad de biomasa generada, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. En los germinados de alfalfa no se observaron cambios significativos en la cantidad de biomasa generada entre los tratamientos de 0.0 – 3.0 mg L⁻¹ de selenio y las plantas control. Por lo tanto, no se observó aumento de la producción de biomasa, tal como se ha reportado para otras especies como *L. sativum* que a bajas concentraciones (0.5 mg L⁻¹) de selenito se estimula el crecimiento (REF).

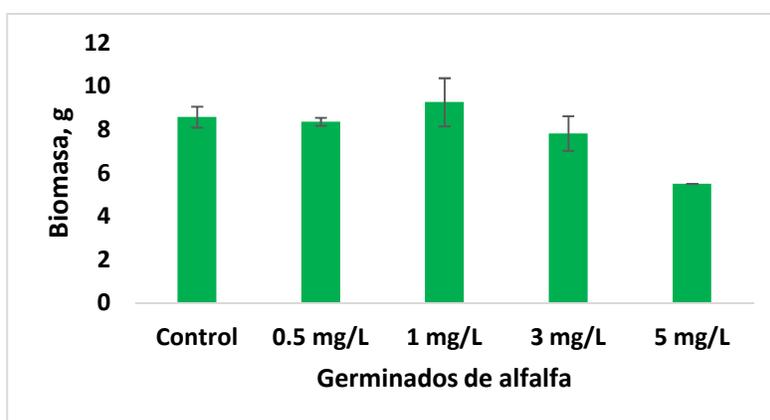


Figura 2. Cantidades de biomasa producidas dependiendo de la concentración de Se(IV) (0–5 mg Se L⁻¹).

No se presentaron efectos fitotóxicos como clorosis, malformación de tejidos o muerte de la planta para ninguno de los tratamientos realizados. Con la excepción del tratamiento a 5 mg Se L⁻¹ donde se presentó inhibición del crecimiento tal como se muestran en las Figuras 3.



Figura 3. Fotos de los cultivos después de 10 días de crecimiento: control y los expuestos a 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg Se L⁻¹.

4.3 Esquema experimental propuesto

En la Figura 4 se presenta el esquema propuesto para el fraccionamiento y el análisis del material biológico obtenido.

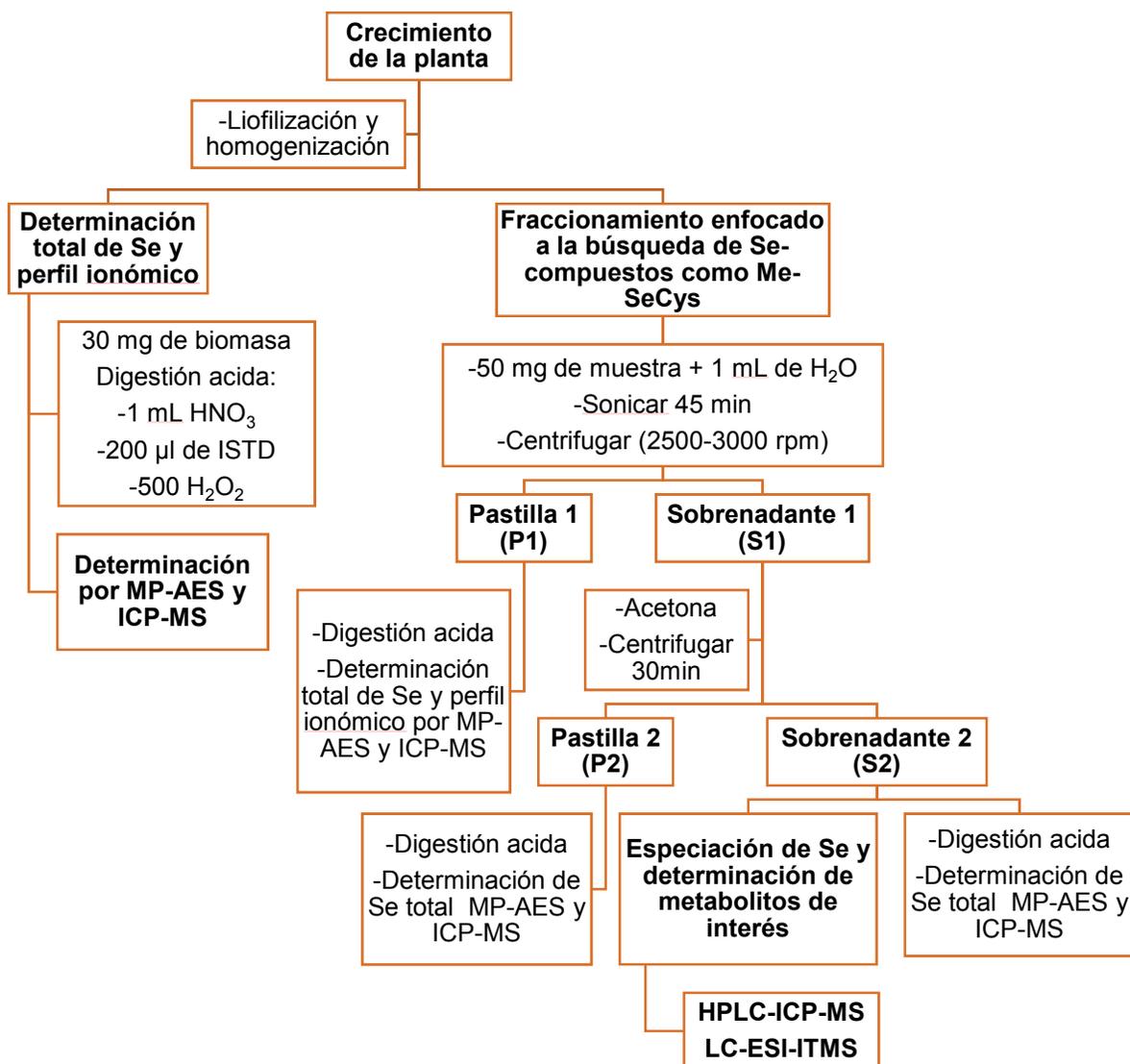


Figura 4. Esquema del procedimiento analítico que se llevará a cabo para evaluar los efectos de selenio en germinados.

A partir de este procedimiento se obtuvieron varias fracciones para su posterior análisis, en la Tabla 7 se presenta la descripción de cada una de ellas.

Tabla 7. Fracciones obtenidas del procedimiento de tratamiento de muestra propuesto

Fracción	Distribución subcelular
Pastilla 1 (P1)	Paredes celulares y compuestos insolubles en agua
Sobrenadante 1 (S1)	Fracción citosólica (compuestos solubles en agua)
Pastilla 2 (P2)	Proteínas, polisacáridos
Sobrenadante 2 (S2)	Compuestos solubles (especies de Se de baja masa molecular)

Para cada fracción obtenida se realizó la determinación del contenido total de selenio por ICP-MS, esto con el fin de realizar un balance de masa e identificar su distribución subcelular.

4.4 Estudio de captación y distribución subcelular de selenio y elementos traza en germinados mediante ICP-MS

La cuantificación del contenido total de selenio y de elementos minoritarios en biomasa de las plantas expuestas a Se (IV), se realizó a partir de biomasa hidrolizada (30 mg de muestra liofilizada, 500 μ L de HNO₃ (69%), 70°C 30 min, 125°C 2 h; 0.5 mL de H₂O₂, 125°C 30 min), previo a la hidrólisis fueron adicionados 200 μ L de la mezcla de estándares internos (In, Y, Bi y Rh (2 mg L⁻¹), Li (10 mg L⁻¹), y Sc (5 mg L⁻¹)), la selección de estos elementos como estándares internos fue para cubrir el rango de relaciones masa/carga (m/z) a analizar. Al término de la hidrólisis, el volumen se ajustó a 2.0 mL con agua desionizada; posteriormente las muestras fueron centrifugadas antes de sus introducción al equipo ICP-MS; se tomaron 250 μ L del hidrolizado los cuales se aforaron a 5.0 mL con agua desionizada.

Previo al análisis se realizó el ajuste de los parámetros de operación del equipo (Tuning de sensibilidad) hasta obtener la respuesta para óxidos y dobles cargas inferior al 2%, esto con el fin de disminuir interferentes que pueden afectar la determinación de los analitos de interés, así como de obtener buena relación señal/ruido para cada una de las relaciones m/z monitoreadas. La técnica ICP-MS no es libre de interferencias, siendo las más importantes las interferencias espectrales poliatómicas, mismas que pueden ser eliminadas mediante el uso de la celda de colisión/reacción. Para nuestro análisis se utilizó el gas He, cuyo flujo se estableció mediante la evaluación de varios flujos del gas seleccionando aquel en donde nuestra relación señal/ruido fuese mayor. Los parámetros de operación del ICP-MS seleccionados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros Instrumentales de ICP-MS para la determinación de contenido elemental

Parámetros Instrumentales ICP-MS	
Potencia	1500 W
Flujo gas nebulizador.	0.89 mL·min ⁻¹
Flujo gas acarreador	0.15 mL·min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard®
Cámara de rociado	2 °C
Tiempo de integración	100 ms
Isotopos monitoreados	⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁶⁸ Zn, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁹⁵ Mo, ¹¹⁵ In, ⁷ Li, ⁸⁹ Y, ²⁰⁹ Bi, ⁴⁵ Sc, ¹⁰³ Rh
Celda de colisión/reacción gas He	4 mL·min ⁻¹

La cuantificación de selenio se llevó a cabo mediante el método de calibración externa, utilizando seis niveles de concentración (0, 0.4, 1.0, 5.0, 10, 50 y 100 µg L⁻¹). Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras, reportándose los valores promedios con sus respectivos valores de desviación estándar.

Tabla 9. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para Se por ICP- MS.

Elemento	LD, ng L ⁻¹	LC, ng L ⁻¹	Función de calibración	r ²
Se	20	66	cps= 0.008c + 0.014	1.000

Los resultados obtenidos de los análisis realizados por ICP-MS (Tabla 10) para Se total, muestran que el contenido de selenio en biomasa se incrementa conforme aumenta la concentración de Se (IV) en el medio.

Tabla 10. Concentraciones de selenio total de germinado de alfalfa.

mg Se L ⁻¹ en medio	µg Se g ⁻¹ en biomasa seca
0	21.1 ± 1.0
0.5	58.5 ± 2.9
1.0	110 ± 6
3.0	258 ± 10
5.0	348 ± 17

Con el fin de evaluar el grado de captación del elemento en las diferentes condiciones de germinación, se determinó el factor de captación biológica (BCF); el cual establece la relación entre la concentración de Se en biomasa respecto a la concentración de Se en medio.

$$BCF = \frac{\mu g \text{ de Se} \cdot g^{-1} \text{ biomasa}}{mg \text{ de Se} \cdot L^{-1} \text{ medio}}$$

Los resultados obtenidos del BCF calculado para cada tratamiento se muestran en la gráfica de la Figura 5 y Tabla 11.

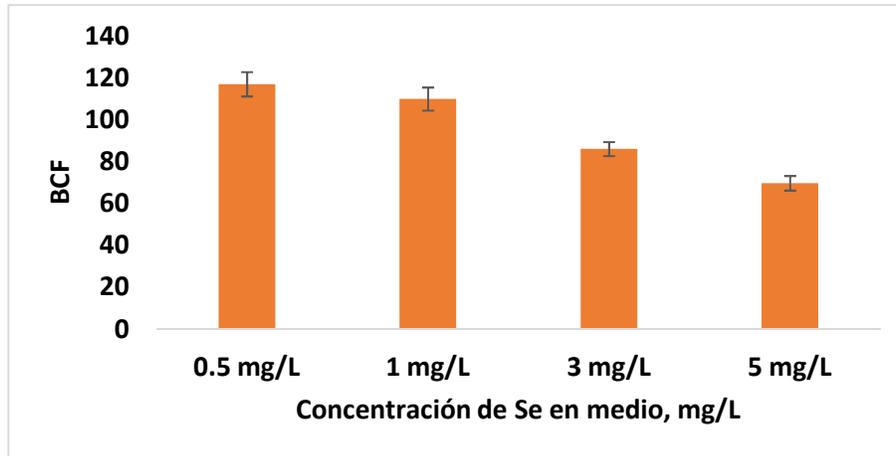


Figura 5. Resultados del cálculo de BCF obtenido para las diferentes condiciones de germinación.

Los resultados obtenidos muestran que los valores más altos de BCF fueron de 117 y 110 para los tratamientos de 0.5 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ellos; por otro lado, para las condiciones de concentraciones más altas (3.0 y 5.0 mg L⁻¹) este factor disminuye significativamente; aunado a lo anterior se puede señalar que las condiciones en las cuales se presenta una adecuada germinación y máxima captación de Se(IV) son en el rango de 0.5 mg L⁻¹ a 1.0 mg L⁻¹, acorde con lo reportado en estudios previos [39].

Tabla 11. Factor de captación biológica (BCF) para cada condición de germinación.

mg L ⁻¹ de Se en medio	BCF ± SD
0.5	117 ± 6
1.0	110 ± 8
3.0	86.0 ± 3.3
5.0	69.6 ± 3.4

Una vez evaluado el contenido total de selenio presente en la biomasa de los germinados obtenidos, se realizó el protocolo de fraccionamiento descrito en la Figura 4, con el objetivo de extraer y posteriormente determinar los Se-compuestos de baja masa molecular. El protocolo de extracción fue a partir de 50 mg de biomasa liofilizada a la cual se añadió 1 mL agua desionizada la muestra

fue sonicada durante 45 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10000 g por 30 min, obteniéndose las fracciones P1 y S1. A S1 se adicionaron 1.2 mL de acetona y se incubó a -20°C durante toda la noche, esto con el objetivo de precipitar las proteínas presentes, después del periodo de incubación la muestra fue centrifugada 10000 g por 30 min, obteniéndose finalmente las fracciones P2 y S2, siendo esta última fracción (S2) la utilizada para llevar a cabo los estudios de especiación por HPLC-ICP-MS.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de conocer la distribución subcelular de Se en la biomasa de los germinados, se llevó a cabo la determinación del contenido total de Se en las fracciones P1, P2 y S2 mediante la técnica de ICP-MS. Previo al análisis las fracciones fueron hidrolizadas con HNO₃ (300 µL, calentamiento a 70°C por 30 min, 125°C por 2h) y H₂O₂ (500 µL 125°C por 30 min), así mismo y tal como se describió anteriormente se realizó la adición de la mezcla de estándares internos (200 µL (In, Y, Bi y Rh (2.0 mg L⁻¹), Li (10 mg L⁻¹) y Sc (5.0 mg L⁻¹)); al término de la mineralización las muestras fueron centrifugadas y diluidas para su posterior análisis.

Los resultados de la determinación del contenido de Se total en las fracciones anteriormente descritas se presentan en la Tabla 12, al igual que los valores de distribución relativa para cada una de ellas en las diferentes condiciones de germinación. Como se puede observar, en primer lugar, el orden de distribución del contenido de Se en cada extracto es P1(82.6% - 88.5%) > S2 (9.19% - 14.3%) > P2 (2.35% - 3.79%); lo que indica una preferente asociación de este elemento con componentes de pared celular y compuestos insolubles en agua, seguido de compuestos solubles en agua de baja masa molecular, siendo la fracción con menor distribución del contenido de Se la referente a proteínas y polisacáridos; en segundo lugar se debe señalar que los valores de distribución relativa no presentaron variación significativa entre los diferentes concentraciones de Se (IV) en el medio.

Tabla 12. Distribución de Se en las fracciones P1, P2 y S2.

mg L ⁻¹ de Se en medio	P1 (µg g ⁻¹)	P1 %	P2 (µg g ⁻¹)	P2 %	S2 (µg g ⁻¹)	S2 %
0	15.2 ± 0.7	82.6 ± 4.1	0.58 ± 0.02	3.17 ± 0.16	2.63 ± 0.13	14.3 ± 0.7
0.5	49.1 ± 2.5	86.8 ± 4.3	1.54 ± 0.08	2.73 ± 0.14	5.93 ± 0.30	10.5 ± 0.5
1.0	82.7 ± 4.1	88.5 ± 4.4	2.20 ± 0.11	2.35 ± 0.12	8.59 ± 0.43	9.19 ± 0.46
3.0	218 ± 11	84.6 ± 4.2	6.88 ± 0.34	2.67 ± 0.14	27.2 ± 1.4	10.5 ± 0.5
5.0	259 ± 13	85.5 ± 4.3	11.5 ± 0.5	3.79 ± 0.19	32.3 ± 1.6	10.7 ± 0.5

La recuperación de Se en el proceso de fraccionamiento fue evaluada mediante la suma del contenido de Se determinado en cada fracción respecto al resultado del contenido de total de Se en biomasa, tal como se muestra a continuación:

$$R = \frac{P1 + P2 + S2}{tSe} * 100$$

Donde:

R = recuperación de Se en el proceso de fraccionamiento

P1 = Pastilla 1

P2 = Pastilla 2

S1 = Sobrenadante 2

tSe = Selenio total en biomasa

En la Tabla 13 se presentan los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos, incluyéndose los valores del contenido de selenio total en biomasa y en fracciones.

Tabla 13. Valores de porcentaje de recuperación

mg L ⁻¹ de Se en medio	Total de Se en biomasa µg g ⁻¹	Total de Se en fracciones µg g ⁻¹	% Recuperación
0	21.1 ± 1.0	18.4 ± 0.9	87.2 ± 4.4
0.5	58.5 ± 2.9	56.6 ± 2.8	96.7 ± 4.8
1.0	110 ± 6	93.5 ± 4.7	85.0 ± 4.2
3.0	258 ± 10	252 ± 12	97.6 ± 4.9
5.0	348 ± 17	303 ± 15	87.0 ± 4.3

Los porcentajes de recuperación obtenidos van del 85.0 % al 97.0 % lo que confirma la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante la aplicación de fraccionamiento propuesto y realizado.

Posterior a la determinación del contenido de Se en biomasa y fracciones, se continuó con la evaluación del efecto de Se(IV) sobre el perfil iónico, para lo cual se llevó a cabo la determinación del contenido total de elementos mayoritarios y traza mediante el uso de las técnicas de ICP-MS y MP-AES respectivamente.

4.5 Análisis ionómico

Para la determinación de elementos traza y mayoritarios, se siguió el protocolo de tratamiento de muestra tal y como se describió anteriormente en la determinación de Se total en biomasa.

Los parámetros de operación instrumental para la determinación de elementos traza por ICP-MS se presentan en la Tabla 8. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de calibración externa, utilizando seis niveles de concentración para cada uno de los elementos (0, 0.4, 1.0, 5.0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$); se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras, reportándose los valores promedios con sus respectivos valores de desviación estándar. En la Tabla 14, se presentan los parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración.

Tabla 14. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para cada uno de los elementos monitoreados por ICP- MS.

Elemento	LD, ng L ⁻¹	LC, ng L ⁻¹	Función de calibración	r ²
Mn	11.7	38.9	cps= 0.412c + 0.273	1.000
Cu	95.7	319	cps= 0.322c + 0.396	1.000
Zn	3.0	10.1	cps= 0.025c + 0.038	0.998
Mo	51.5	172	cps= 0.074c - 0.021	1.000
Ni	5.9	19.6	cps=0.126c + 0.082	0.999

Para asegurar la buena exactitud de los resultados analíticos, con cada corrida de muestras se llevó a cabo el análisis del material de referencia NIST 1572 Citrus Leaves. En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos; observándose la concordancia de los resultados para todos los elementos con los valores certificados, lo que confirma buena exactitud de los resultados analíticos obtenidos.

Tabla 15. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos minoritarios en material certificado NIST 1572.

Elemento	Análisis del material de referencia	
	Valor certificado, mg L ⁻¹	Valor encontrado, mg L ⁻¹
Mn	23.0 ± 2.0	21.9 ± 1.7
Cu	16.5 ± 1.0	16.9 ± 0.6
Zn	29.0 ± 2.0	32.2 ± 1.3
Ni	0.6 ± 0.3	0.24 ± 0.2
Mo	0.17 ± 0.09	0.30 ± 0.1

En la Tabla 16 se presentan las concentraciones de elementos traza encontradas en biomasa de las diferentes condiciones de germinación; en donde en primer

lugar, se puede observar que para todos los tratamientos con Se la cantidad de Ni, Cu y Mo es menor respecto a los cultivos control, no expuestos a Se(IV); mientras que, para Mn y Zn los niveles encontrados en los brotes obtenidos con Se es mayor que en los controles.

Tabla 16. Niveles de concentración de elementos minoritarios encontrados en biomasa después de exposición a Se (IV).

Elemento en biomasa, promedio \pm DE, $\mu\text{g g}^{-1}$ (masa seca), n=3 para alfalfa					
mg L⁻¹ de Se en medio	Mn	Ni	Cu	Zn	Mo
0	47.8 \pm 2.4	4.50 \pm 0.17	20.1 \pm 1.0	58.8 \pm 2.9	205 \pm 10
0.5	48.4 \pm 2.1	4.32 \pm 0.16	17.8 \pm 0.9	57.0 \pm 2.8	170 \pm 8
1.0	48.1 \pm 2.4	4.12 \pm 0.20	17.2 \pm 0.6	58.4 \pm 2.6	178 \pm 9
3.0	48.5 \pm 1.8	4.03 \pm 0.11	17.3 \pm 0.8	61.0 \pm 3.0	175 \pm 9
5.0	48.0 \pm 2.3	2.91 \pm 0.15	16.2 \pm 0.8	62.1 \pm 3.1	171 \pm 8

Una vez realizada la determinación de elementos traza por ICP-MS, se prosiguió a con la determinación de elementos mayoritarios por MP-AES; para lo cual se llevó a cabo la selección de las longitudes de onda para cada elemento empleando el criterio de la mejor posible relación señal/ruido. El proceso de selección de parámetros del equipo se realizó mediante la variación para cada longitud de onda, de la presión de nebulización y posición del visualizador. Los parámetros instrumentales del MP-AES para el análisis de elementos mayoritarios se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Parámetros Instrumentales de MP-AES para la determinación de contenido elemental.

Parámetros Instrumentales de MP-AES			
Nebulizador	One Nebulizer		
Cámara de niebla	Ciclónica de un solo paso		
Tiempo de integración	3 s		
Flujo de introducción de muestra	1 mL min ⁻¹		
Elemento	Longitud de onda (nm)	Presión de Nebulización (kPa)	Posición de Lectura
Ca	445.478	80	-10
Mg	279.553	240	0
Fe	259.940	240	-30
Na	589.592	100	-10
K	769.897	240	-10

La cuantificación de los elementos mayoritarios se realizó mediante el método calibración externa, utilizando seis niveles de concentración (0, 0.5, 1.0, 3.0, 10 y

20 mg L⁻¹) para cada uno de los elementos. En la Tabla 18, se presentan los parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración.

Tabla 18. Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración para cada uno de los elementos monitoreados por MP-AES.

Elemento	λ (nm)	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LC, $\mu\text{g L}^{-1}$	Función de calibración	r^2
Ca	445.478	3.8	12.5	Int = 1265.6c - 70.951	0.9994
Na	589.592	1.6	5.2	Int = 155291c - 7518.4	0.9993
Mg	279.553	5.6	18.8	Int = 72707c - 2794.9	0.9996
Fe	259.940	6.1	20.3	Int = 3214.3c + 8.6962	0.9994
K	769.897	1.1	3.6	Int = 24534c - 1007.6	1.0000

Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras, reportándose los valores promedios con sus respectivos valores de desviación estándar.

De igual manera para asegurar la buena exactitud de los resultados analíticos, con cada corrida de muestras se llevó a cabo el análisis del material de referencia NIST 1572 Citrus Leaves. En las Tabla 19 se presentan los resultados obtenidos; observándose similitud de los resultados obtenidos con los valores certificados, para todos los elementos monitoreados.

Tabla 19. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos mayoritarios en material certificado NIST 1572.

Elemento	Análisis del material de referencia	
	Valor certificado, % en peso	Valor encontrado, % en peso
Ca	3.15 ± 0.10	3.23 ± 0.12
K	1.82 ± 0.06	1.86 ± 0.01
Mg	0.58 ± 0.03	0.57 ± 0.01
	Valor certificado, mg L ⁻¹	Valor encontrado, mg L ⁻¹
Fe	90 ± 10	79.4 ± 1.5
Na	160 ± 20	171 ± 3

Los resultados obtenidos de la determinación de elementos mayoritarios son presentados en la Tabla 20, donde se puede observar que las concentraciones de Ca fueron más bajas en los germinados enriquecidos con Se (IV) comparado con el control, (comportamiento opuesto al reportado en el trabajo de licenciatura); mientras que para el K los tratamientos con selenio causaron un aumento paulatino de la concentración de este elemento en biomasa respecto al control, tal y como se reportó en estudio previo en donde las mayores concentraciones de K se reportaron para aquellos tratamientos con Se (IV) de mayor concentración (5 y 10 mg L⁻¹) [39]. Por otro lado, para otros elementos no se observan a simple vista tendencias asociadas al contenido de Se(IV) o diferencias con el contenido de los controles, por lo cual se realizó el análisis de componentes principales (PCA por

sus siglas en inglés), a partir de los resultados obtenidos de la determinación del contenido total de selenio, elementos traza y mayoritarios, con el fin de poder observar posibles asociaciones o tendencias entre el contenido de Se y elementos determinados.

Tabla 20. Niveles de concentración de elementos mayoritarios encontrados en biomasa después de exposición a Se (IV).

Elemento en biomasa, promedio \pm DE, mg g ⁻¹ (masa seca), n=3 para alfalfa					
mg L ⁻¹ de Se en medio	Ca	Na	Fe	Mg	K
0	2.02 \pm 0.01	0.57 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	3.47 \pm 0.06	17.9 \pm 0.1
0.5	1.94 \pm 0.02	0.54 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	3.49 \pm 0.08	16.7 \pm 0.0
1.0	1.48 \pm 0.00	0.71 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	2.64 \pm 0.05	18.9 \pm 0.1
3.0	1.53 \pm 0.08	0.63 \pm 0.03	0.10 \pm 0.00	2.67 \pm 0.04	19.7 \pm 0.1
5	1.41 \pm 0.01	0.39 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	2.67 \pm 0.06	19.7 \pm 0.0

4.6 Análisis de componentes principales (PCA)

En el análisis por método de componentes principales, se reduce la dimensionalidad del sistema estudiado, obteniéndose nuevas coordenadas artificiales llamadas componentes principales que permiten visualizar mejor la estructura de los datos que caracterizan dicho sistema. En la construcción del modelo PCA, las variables consideradas fueron los niveles de concentración determinados en biomasa de Se, elementos traza (Zn, Mn, Cu, Mo y Ni) y mayoritarios (Ca, Mg, Na, Fe y K) en las diferentes condiciones de exposición a Se (IV). En la Figura 6 se presentan la gráfica del PCA obtenido para la alfalfa, en donde los primeros dos componentes representan el 79% de la varianza total de los datos monitoreados, la gráfica superior (*scores*) representa la distribución de los cultivos (muestras) en las coordenadas de los dos primeros componentes principales (PCs), ordenándolos de acuerdo con la creciente concentración de Se(IV) en el medio: desde cultivo control y el expuesto a 0.5 mg Se L⁻¹ ubicados en espacio de valores negativos de PC1, hasta cultivos expuestos a más altas concentraciones de Se(IV) con valores positivos de PC1

En la gráfica inferior correspondiente a la distribución de las variables monitoreadas (*loadings*), se observa agrupación de las variables K, Zn, Se, Mn en el espacio correspondiente a altas concentraciones de Se en el medio (valores positivos del PC1), confirmando los datos presentados en las Tablas 16 y 20. Por su parte, las variables Cu, Mo, Ca y Mg quedan agrupados en el espacio correspondiente a cultivo control y expuesto a 0.5 mg Se L⁻¹, lo que indica una inhibición de la captación de estos elementos durante germinación en presencia de Se(IV).

En el trabajo previo [39], se determinaron Ni, Mn, Cu, Zn, Mo, Ca, Na, K, Fe y Mg en biomasa de la planta de alfalfa la cual fue expuesta a selenio por un periodo de 10 días de crecimiento. En dicho estudio, se detectó una mayor captación de Cu, Mn, Mo, Ca y K en presencia de Se(IV) y una disminución de la captación para el resto de los elementos. En el caso de los germinados, los resultados para Mn y K fueron en concordancia con el trabajo anterior, mientras que para Na y Zn el efecto fue contrario (menor captación en presencia de Se(IV) durante germinación). Observando esta comparación se puede sugerir cambios en la asimilación de Se y en las propiedades nutricionales dependiendo del estado de desarrollo de la planta.

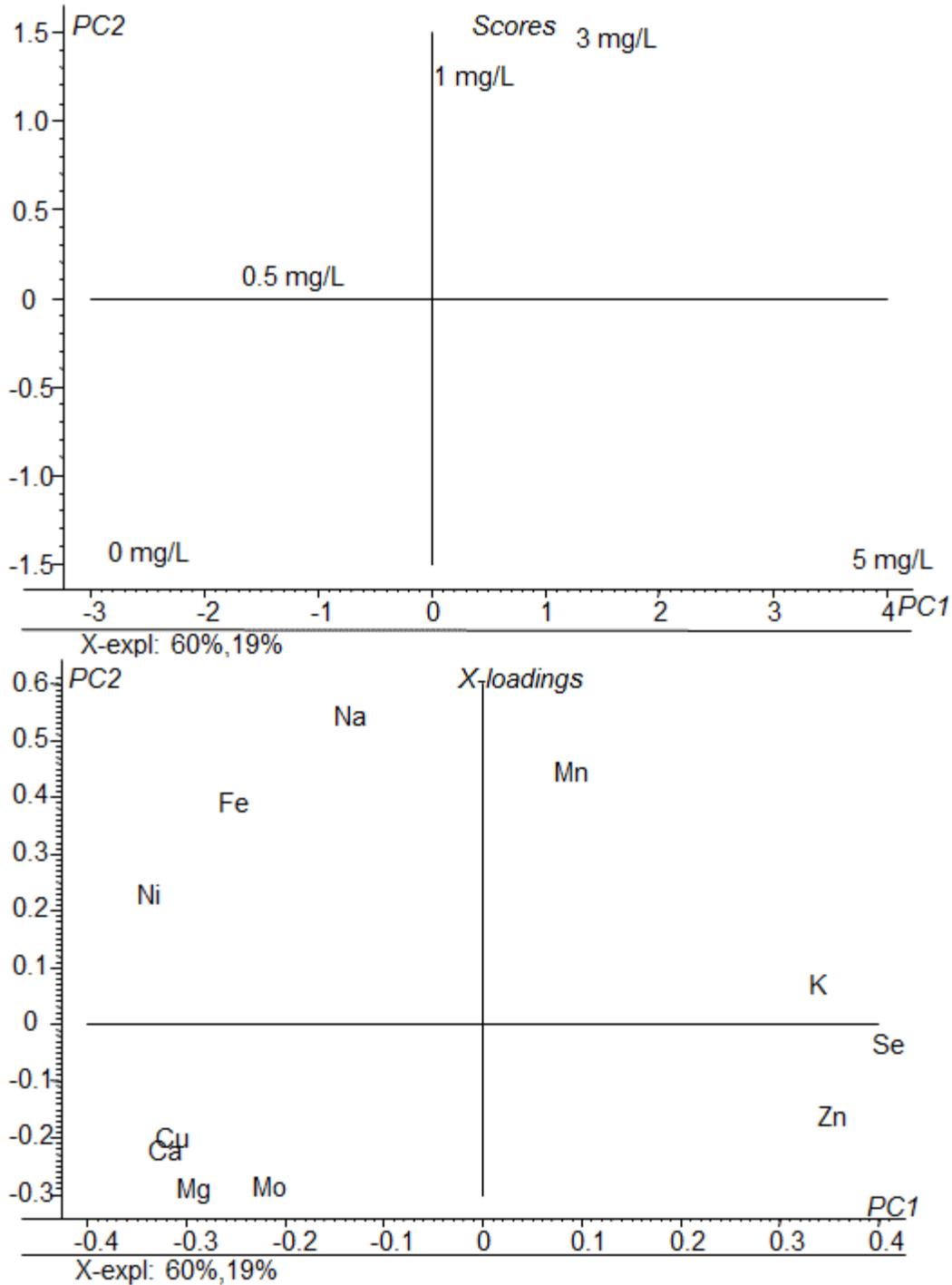


Figura 6. Análisis por el método de componentes principales (PCA) de los niveles de concentración de elementos (mayoritarios y minoritarios) encontrados en biomasa de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de Se(IV). Arriba: Gráfica bidimensional de la estructura de los datos (scores) en el sistema estudiado. Abajo: Gráfica bidimensional de las variables monitoreadas en el espacio definido por los componentes principales.

En cuanto a Mn, K, Zn y Na cuya captación fue favorecida por la exposición a Se (IV), los procesos fisiológicos en los que se ha reportado participación de estos elementos son el transporte de electrones durante la fotosíntesis (Mn), protección de células frente a daño oxidativo (Mn) y sustitución de funciones de K (Na), turgencia celular (K) y neutralidad eléctrica (K), protección contra daño oxidativo (Zn). Para Ca, Mo, Mg y Cu, cuya captación disminuyó bajo exposición a Se (IV), los procesos fisiológicos en los que participan estos elementos son formación de pared celular (Ca), regulación metabólica (Ca), cofactor en enzimas como nitrato reductasa y nitrogenasa (Mo), síntesis de clorofila (Mg) y protección contra el estrés oxidativo y síntesis de la pared celular (Cu). En la Tabla 21 se resumen los principales procesos fisiológicos en los que participan los elementos con una regulación positiva causada por la exposición a Se (IV).

Tabla 21. Principales procesos fisiológicos en los que participan elementos esenciales cuya captación se asocia directamente a la exposición a Se(IV).

Planta	sinergismo	Importancia de metals afectados
Alfalfa	Mn, K, Zn, Na	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de electrones en la fotosíntesis. • Protección de las células contra daño oxidativo. <ul style="list-style-type: none"> • Turgencia celular • neutralidad eléctrica • Actividad de la enzima súper óxido dismutasa. <ul style="list-style-type: none"> • Sustitución de funciones de K

Los resultados obtenidos sugieren que el selenio podría ayudar a la absorción de algunos nutrientes minerales (Tabla 21), de importancia la producción de un posible alimento funcional.

4.7 Evaluación de biotransformación de selenio (IV) a selenio orgánico en germinados de alfalfa mediante análisis de especiación de selenio por HLPC-ICP-MS, LC-ESI-IT-MS y LC-ESI-QTOF-MS

La distribución de Se en los órganos de las plantas es específica y depende del estado de desarrollo y condiciones fisiológicas de la misma. La capacidad de las plantas de acumulación y biotransformación de especies inorgánicas de selenio (iSe) a especies orgánicas (oSe), como selenometionina (SeMet), metilselenocisteína (MeSeCys) o γ -glutamyl-Se-metil-selenocisteína es un factor crucial para considerar la viabilidad de la utilización de Se en el diseño de estrategias de biofortificación en plantas, como se ha descrito, la mayoría de los efectos benéficos reportados como la capacidad antioxidante y quimiopreventiva se han observado principalmente en compuestos orgánicos de selenio (oSe) de baja masa molecular. [81-83]. Aunado a la esencialidad del selenio (en seres humanos y animales) y a los efectos benéficos que han sido atribuidos al consumo de Seleno-compuestos sintetizados por plantas y levaduras en la salud de humanos y animales, surge la necesidad de contribuir en el conocimiento de los mecanismos de acumulación y metabolismo de este elemento en plantas, así como de los efectos que tiene sobre la calidad nutricional de cultivos expuestos, lo que contribuiría con el desarrollo de estrategias de biofortificación.

En este sentido y con base en los resultados obtenidos de la determinación del contenido total de selenio y mediante el desarrollo/implementación de procedimientos analíticos utilizados en las áreas de investigación emergente como la metalómica y metabolómica, se llevó a cabo la determinación de diferentes especies de selenio presentes en la biomasa, así como en las fracciones subcelulares descritas anteriormente (Figura 4); utilizando las técnicas de ICP-MS, LC-ESI-IT-MS y LC-ESI-QTOF-MS.

4.7.1 Análisis de especiación de Se por HLPC-ICP-MS

Siguiendo el esquema de tratamiento de muestra propuesto en la Figura 4, se tomó la fracción S2 para la determinación de especies de selenio mediante el uso de la técnica híbrida de separación cromatográfica acoplada al espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS). Los parámetros de operación instrumental se muestran en la Tabla 22. Al igual que para la determinación del contenido elemental y con el fin de obtener las mejores condiciones de detección en ICP-MS, se realizó el ajuste de parámetros instrumentales (Tuning de sensibilidad), monitoreando las relaciones m/z 78 y 82 para la obtención de la mejor posible relación señal/ruido. Las condiciones de operación del sistema HPLC-ICP-MS se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros Instrumentales de HPLC-ICP-MS para la determinación de especies de selenio.

Parámetros Instrumentales HPLC-ICP-MS	
Potencia	1500 W
Flujo gas nebulizador.	0.75 mL min ⁻¹
Flujo gas make-up	0.18 mL min ⁻¹
Nebulizador	Miramist ®
Cámara de rociado	2 °C
Adquisición de la señal	Time-resolved
Tiempo de integración	100 ms
Isotopos monitoreados	⁷⁸ Se, ⁸² Se
Celda de colisión/reacción gas He	4 mL min ⁻¹
Columna	Polaris C18
Fase móvil	Ácido Heptafluorobutírico 0.1%(98%), MeOH(2%)
Elución	Isocrático
Flujo	1.0 mL min ⁻¹
volumen de inyección	20 µL

De la fracción S2 se tomaron 100 µL los cuales fueron diluidos 10 veces con fase móvil y posteriormente centrifugados a 10000 g por 20 min para su introducción al sistema HPLC-ICP-MS; 4 especies de selenio: Selenio inorgánico (Se(IV) y Se(VI)), Selenometionina (SeMet), Selenocisteína (SeCys) y Metilselenocisteína (MeSeCys). La asignación de los picos cromatográficos se basó en los tiempos de retención comparando con los estándares: Se (IV), SeMet, MeSeCys y SeCys.

En la Tabla 23 se presentan los tiempos de retención de cada especie identificada. En la Figura 7 se muestra el típico cromatograma de las diferentes especies selenio a la concentración de 50 µg L⁻¹.

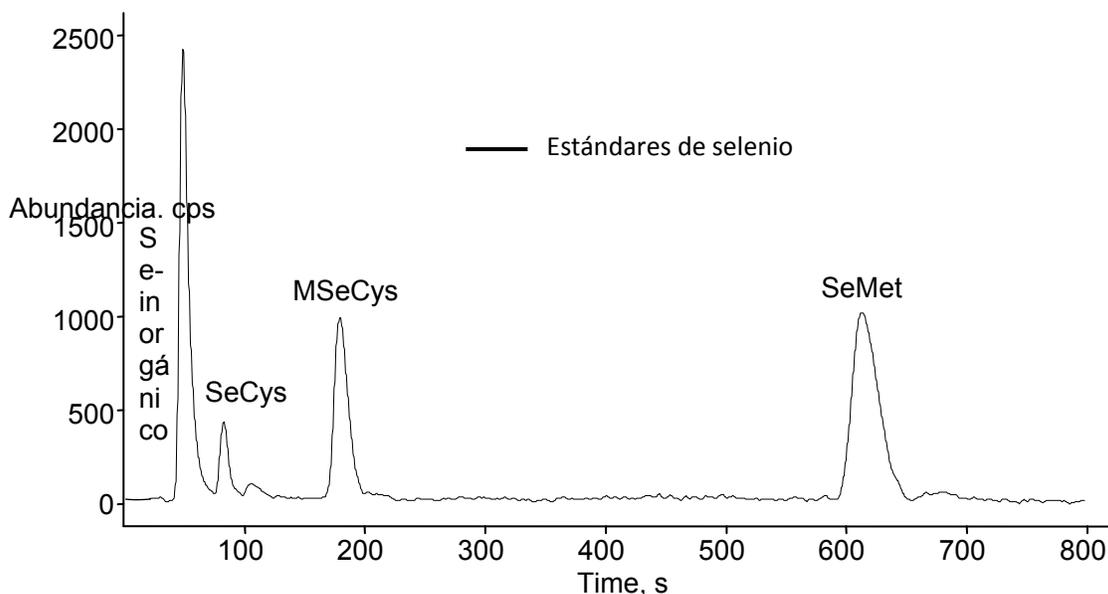


Figura 7. Típico cromatograma correspondiente a los estándares de las 4 especies de selenio determinadas Selenio inorgánico, Selenocisteína, Metilselenocisteína y Selenometionina ($50 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 23. Tiempos de retención para cada especie de selenio determinada y especies encontradas en germinado de alfalfa tratadas con 5.0 mg Se L^{-1} .

Especie de Se	TR (min)	Especies de Se en germinados de Alfalfa
Se Inorgánico	0.8	iSe
SeCys	1.4	No detectado
MSeCys	3.0	MSeCys
SeMet	10.2	SeMet

Para el caso de los germinados de alfalfa se realizó el análisis de especiación para el tratamiento con Se de 5.0 mg L^{-1} . En la Figura 8 se presentan los cromatogramas correspondientes al tratamiento de 5.0 mg L^{-1} y estándares de especies de selenio. Las especies identificadas en los germinados para este tratamiento fueron selenio inorgánico, selenocisteína, metilselenocisteína y selenometionina siendo la segunda la más predominante en biomasa.

Para el cromatograma correspondiente al tratamiento de 5.0 mg L^{-1} se puede observar la presencia de otras especies de selenio no identificadas, con tiempo de retención de 2.0, 2.6 y 9 min.

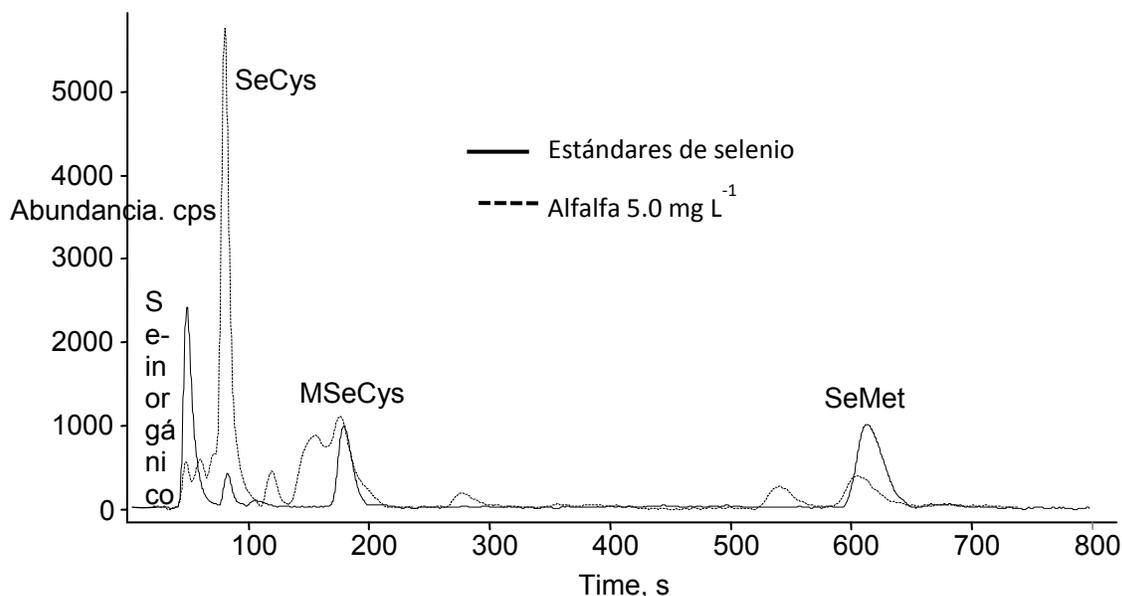


Figura 8. Típico cromatograma HPLC-ICP-MS de estándares de selenio y de extracto de alfalfa expuesta a 5 mg L⁻¹.

Por lo tanto en el estudio de especiación por HPLC-ICP-MS donde se pudo apreciar una completa conversión de selenio inorgánico a selenio orgánico.

Como antecedentes tenemos; el análisis de especiación se logró identificar selenio inorgánico (en todos los tratamientos) y selenometionina (únicamente en los tratamientos donde fue adicionado Se(IV)) para la planta de alfalfa. El procedimiento utilizado para la liberación de Se-compuesto fue por medio de una hidrólisis de las proteínas utilizando ácido metánsulfónico [39].

En comparación con los germinados donde se utilizó una extracción con agua siguiendo el esquema de tratamiento de muestra propuesto de la Figura 4. Las especies identificadas fueron selenio inorgánico, selenocisteína, metilselenocisteína y selenometionina. Es evidente la presencia de otras 2 especies de selenio (selenocisteína y metilselenocisteína) las cuales se solubilizaron en el extracto acuoso en comparación de la hidrólisis realizada en el trabajo de licenciatura. Por lo tanto podemos sugerir que los germinados de alfalfa tienen la capacidad de acumular especies de selenio no protéicas con impórtate efectos biológicos como MeSeCys.

La presencia de estas especies como metilselenocisteína y selenometionina han sido reportadas en germinados de alfalfa cultivadas en presencia de Se-metionina, donde las especies de selenio también fueron encontradas en el extracto acuoso [8].

La diferencia entre Se-aminoácidos libres y Se-aminoácidos conjugados con proteínas se ha vuelto nutricionalmente importante, considerando que los Se-aminoácidos libres están más disponibles para la absorción/utilización que los seleno aminoácidos incorporados en proteínas. Por lo tanto, MeSeCys parece ser la especie de Se libre acumulada en brotes de alfalfa. Por lo tanto, los brotes de alfalfa enriquecidos con Se podrían ser de gran interés en la investigación como un complemento alimenticio para proporcionar un nivel adecuado de MeSeCys en la dieta [84].

4.7.2 Determinación de Se-aminoácidos por LC-ESI-ITMS en modo de MRM (monitoreo de reacciones múltiples)

Los análisis de la especiación de selenio reportados en la literatura se basan principalmente en el acoplamiento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se han utilizado diversos métodos de HPLC, siendo la exclusión por el tamaño molecular (SEC-HPLC) y la separación en fase inversa con formación de pares iónicos (IP-RP-HPLC) los métodos más utilizados. Sin embargo, HPLC-ICP-MS no puede proporcionar información estructural para la identificación de compuestos conocidos y desconocidos en plantas enriquecidas con selenio. La HPLC acoplada a la técnica de espectrometría de masas molecular (HPLC-ESI-MS y MS/MS) se ha convertido en una estrategia más popular para la identificación de especies de selenio. La sensibilidad de la detección de ESI-MS puede aumentarse para la detección dirigida de compuestos de Se en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). En este método, se selecciona un ion precursor y un ion cuantificador que es uno de los productos de su fragmentación. Al monitorear directamente m/z del ion cuantificador, se aumenta la selectividad hacia el compuesto de interés y, que es muy importante, se disminuye de manera substancial el ruido. El propósito del presente estudio fue desarrollar un método de identificación y cuantificación para la especiación de selenio en germinados de alfalfa basado en HPLC-ESI-MS/MS [80].

La separación en fase reversa, especialmente utilizando las columnas de núcleo sólido, ofrece muy buena resolución y un gran desempeño analítico. Al mismo tiempo, el uso de fases móviles compatibles con fuentes de ionización suaves y con detectores másicos permite acoplamiento de la etapa separación con la espectrometría de masas. Es por ello que se optó por esta estrategia para lograr la identificación/cuantificación de oSe en este trabajo. No obstante, las especies de oSe como los Se-aminoácidos, son moléculas solubles en agua y con polaridad alta que no son retenidas en la columna de fase reversa. Para este caso, ha sido necesario llevar a cabo una derivatización pre-columna con el fin de obtener compuestos de menor polaridad.

Las reacciones de derivatización con aquil cloroformiatos son comúnmente utilizadas ya que alquilan compuestos con grupos amino primarios y secundarios, así como con grupos carboxilo y hidroxilo. Entre las ventajas hay que mencionar una buena cinética y eficacia, la reacción se lleva a cabo en un medio acuoso a temperatura ambiente y que los compuestos formados pueden ser analizados por cromatografía de líquidos en fase reversa [85, 86].

En este trabajo se utilizó propilcloroformiato como agente derivatizante para los seleno aminoácidos, estos fueron separados y analizados por medio de HPLC-ITMS en la modalidad de MRM. En esta modalidad, se monitorean dos transiciones del ion precursor; el ion cuantificador y el ion cualificador. Esto permite mejorar la selectividad hacia las especies objetivo y eliminar eficientemente el fondo espectral mejorando la detección de compuestos de selenio.

4.7.2.1 Extracción de Se-compuestos de tejidos vegetales

A 50 mg de biomasa se añadió 1 mL de agua desionizada, la mezcla fue puesta en un baño de ultrasonido por 45 min a temperatura ambiente. Después la muestra se centrifugó a 10000 g por 30 min. Una vez centrifugada se separó el sobrenadante acuoso y posteriormente fue liofilizado. Por último, sobre el sobrenadante liofilizado se realizó la derivatización con propilcloroformiato (PCF).

4.7.2.2 Protocolo de derivatización

Como ya se ha mencionado antes, el principal enfoque de la derivatización y del análisis fue en los Se-aminoácidos. Para la derivatización de los estándares o muestras se agregó 280 μL de una mezcla 1-propanol:piridina (6:1, v/v), consecutivamente se adicionó 260 μL de NaOH 0.3 N, seguido de dos adiciones sucesivas de PCF (30 μL). Después de cada adición, las mezclas se agitaron y destaparon rápidamente para permitir que saliera el dióxido de carbono generado durante la reacción. Posteriormente se agregaron 400 μL de iso-octano con la finalidad de extraer los compuestos derivatizados a la fase orgánica, finalmente se adiciono 200 μL de HCl 1N para la conservación de nuestros compuestos. A continuación fueron centrifugadas a 13,000 g por 10 min, esto para separar la fase acuosa la cual es desechada y la fase orgánica se evaporo a temperatura ambiente y se reconstituyo en 150 μL de fase móvil (formiato de amonio 5 mM:Acetonitrilo, 60:40 v/v).

La derivatización con propil cloroformiato (PCF) es una reacción de alquilación que ocurre con grupos aminos primarios y secundarios, así como con grupos carboxilo/hidroxilo. De esta manera, los ácidos orgánicos amino y no amino se pueden convertir en ésteres y carbamatos adecuados para ser analizados por GC-

MS o LC-MS. La reacción general de PCF se detalla en la Figura 9. La molécula de PCF es muy reactiva y se descompondrá fácilmente en presencia de agua, produciendo ácido clorhídrico y etanol. Sin embargo, en presencia de piridina y en condiciones alcalinas, sufre un ataque nucleofílico, con el cloro como grupo saliente. El oxígeno en los grupos carboxilo o el nitrógeno en los grupos amino primarios o secundarios de los metabolitos funciona como una base y reemplaza al cloro. Con los ácidos carboxílicos, las especies de transición, un anhídrido, son atacadas por el par de electrones del oxígeno del metanol, liberando una molécula de carbonato de propilo y formando un éster. Para los grupos amino, el carbonato de propilo permanece unido al nitrógeno, que pierde un protón, formando un grupo carbamato.

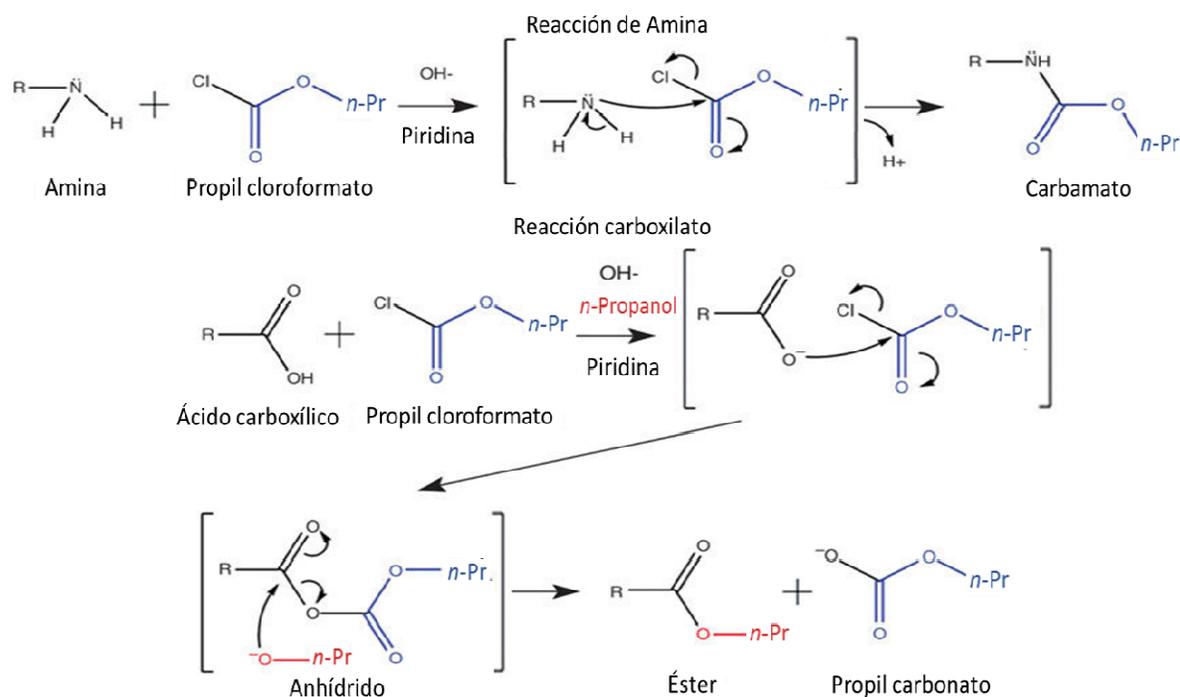


Figura 9. Mecanismo general de la derivatización de una amina y de un ácido con propil cloroformato, la reacción de alquilación con propil cloroformato convierte al grupo amino y ácidos orgánicos en ésteres y carbamatos, respectivamente[86].

Se determinaron tres Se-aminoácidos: Selenometionina (SeMet), Selenocistina (SeCys)₂ y Metilselenocisteína (MeSeCys). También se determinaron sus análogos de azufre: Metionina (Met), Cistina (Cys₂) y Cisteína (Cys). Después de la derivatización con propil cloroformiato cada compuesto gana un incremento de 42 uma (unidades de masa atómica) por cada grupo carboxílico presente en la molécula y de 86 uma para cada grupo amino primario o secundario derivatizados por lo tanto aumentando la masa molecular de cada compuesto (Tablas 26 y 27). Primeramente una mezcla de estándares se inyectó a un sistema HPLC-ESI-ITMS/MS con adquisición en el modo Full Scan, en un intervalo de *m/z* 150 - 650.

Las condiciones de separación cromatográfica se presentan en la Tabla 24. Los espectros de masas se obtuvieron en modo UltraScan en el rango de m/z 150-650, con ICC (Carga de Control de Iones) en 100,000 y el tiempo máximo de acumulación de iones en trampa de 100 ms. En cuanto al parámetro SPS (Smart Parameter Settings) usado para la optimización automática de la trampa se fijó en 400 m/z y la estabilidad del compuesto a 50 %. 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.

Esto nos permitió obtener el orden de elución y los valores m/z para iones precursores de cada uno de los estándares utilizados. Los picos fueron asignados a los compuestos individuales con base a sus tiempos de retención y espectros de masas; lo que nos llevó a definir condiciones instrumentales. En Figura 10 se muestra un cromatograma de las diferentes especies de selenio a la concentración de 5 mg L⁻¹.

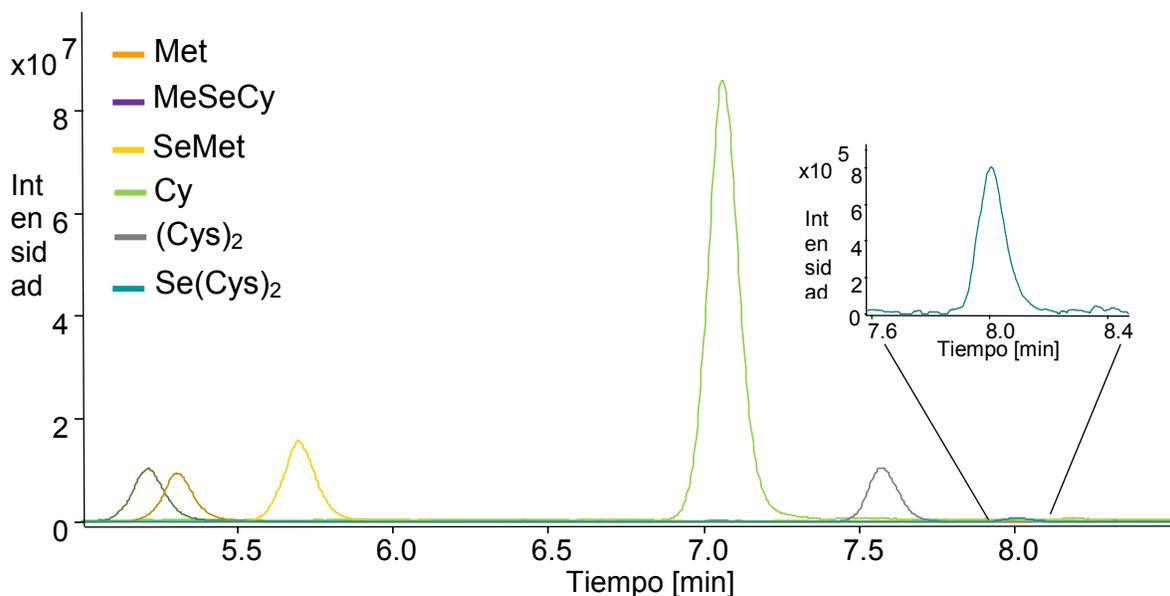
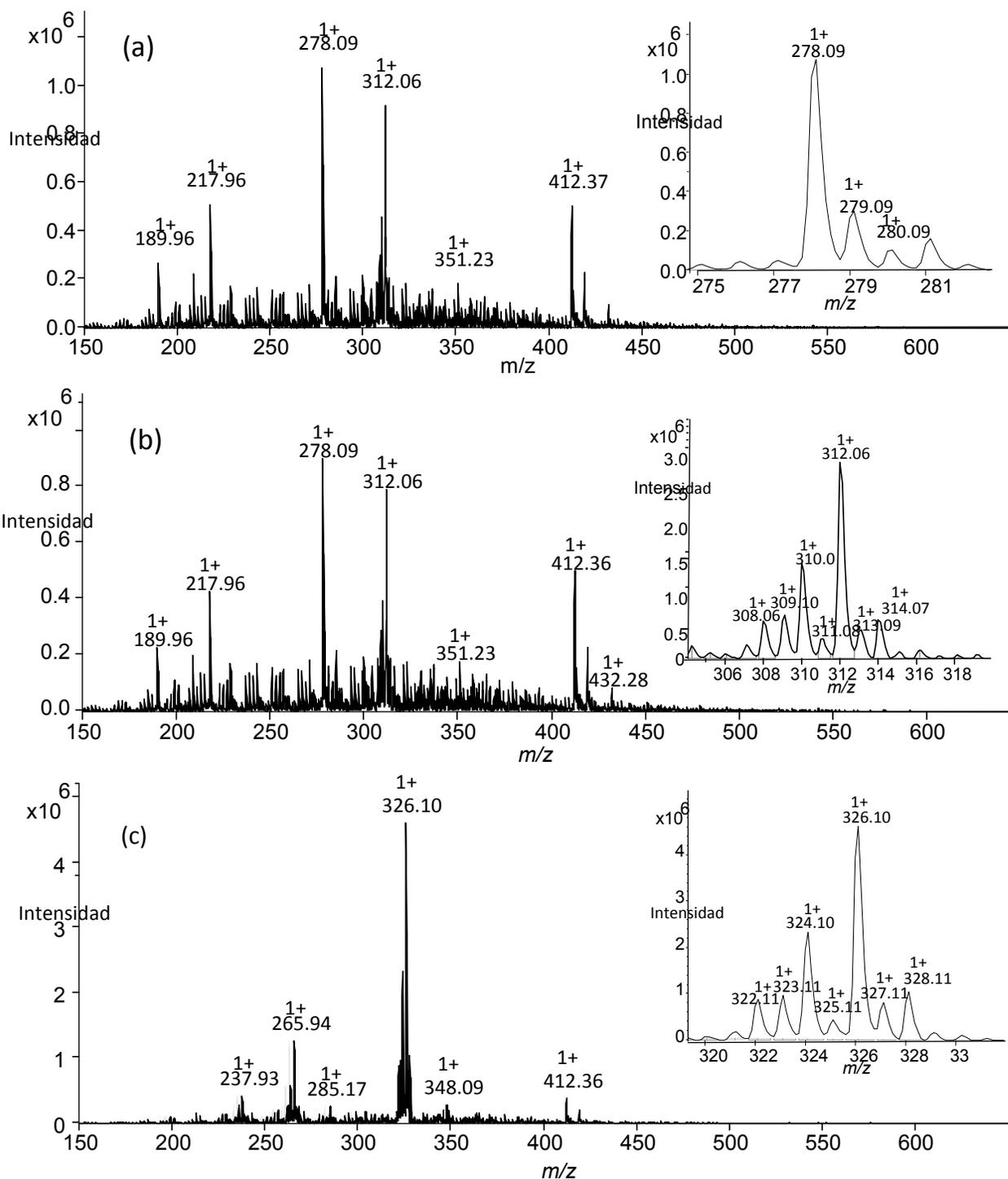


Figura 10. Cromatogramas EIC de una solución de estándares de aminoácidos (5 mg L⁻¹).

Se detectaron iones-moleculares protonados $[M + H]^+$ de todos los isótopos de Se en los espectros de masas de los tres Se-aminoácidos, los cuales están presentes en la Figura 11. Las m/z de los iones precursores fueron 278, 312, 326, 336, 497 y 593 para Met, MeSeCys, SeMet, Cys, Cys₂ y SeCys respectivamente.

Para el análisis cuantitativo de Met, MeSeCys, SeMet, Cys, Cys₂ y (SeCys)₂, se optimizaron diferentes amplitudes de fragmentación para cada ion monitoreado y

de esta manera se consiguieron los pares de iones precursor – cuantificador y precursor-cualificador para el modo MRM.



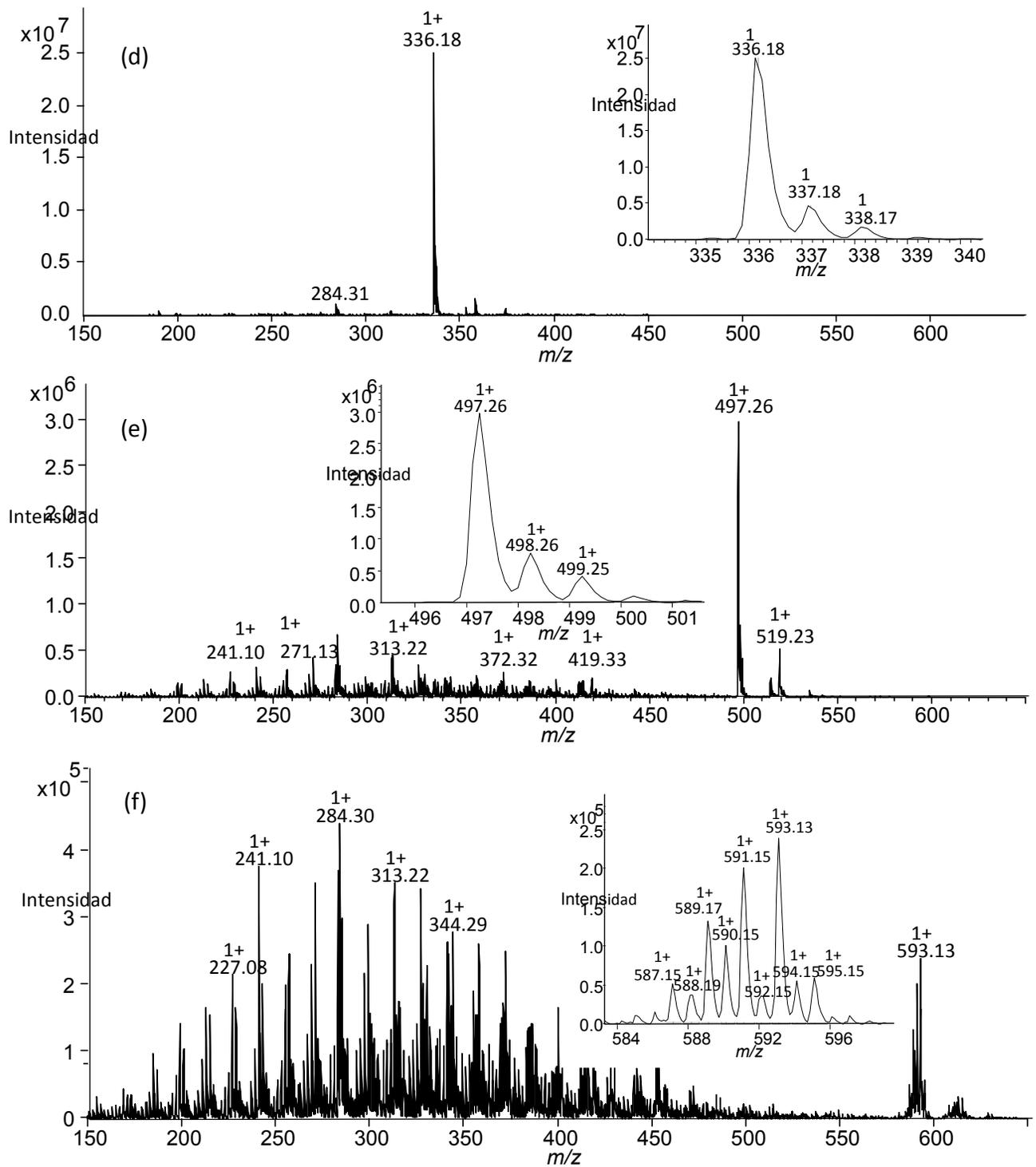
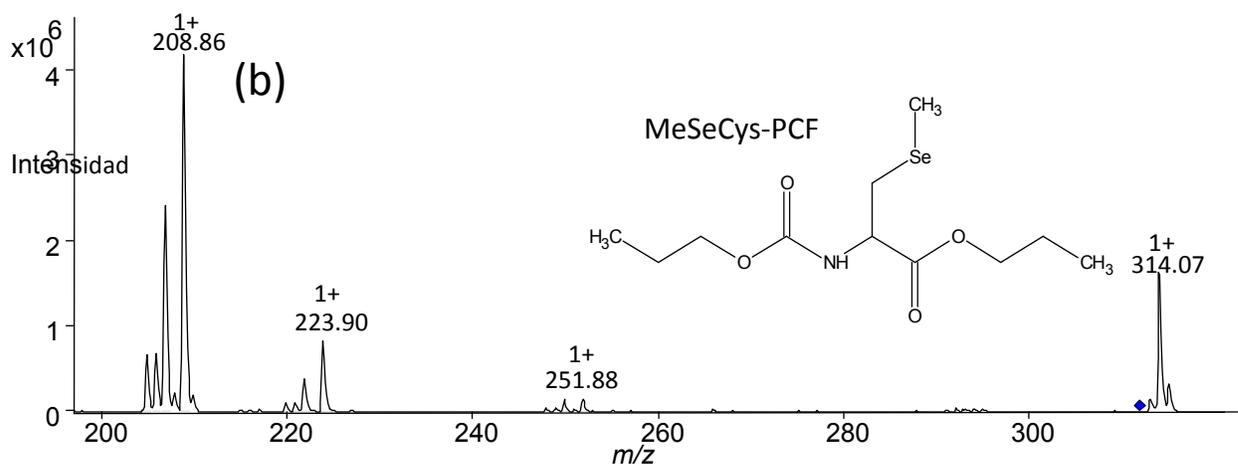
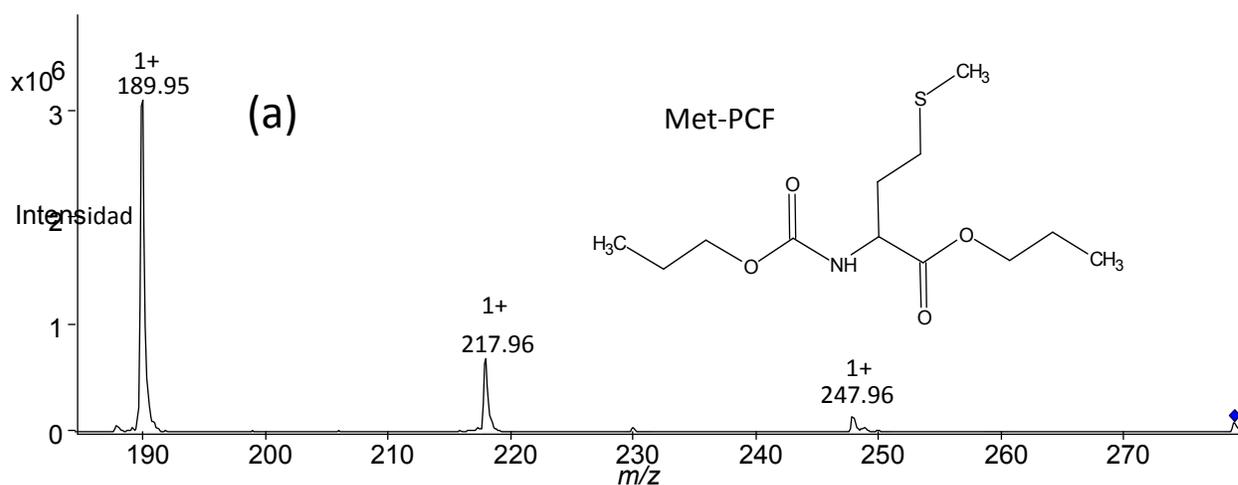
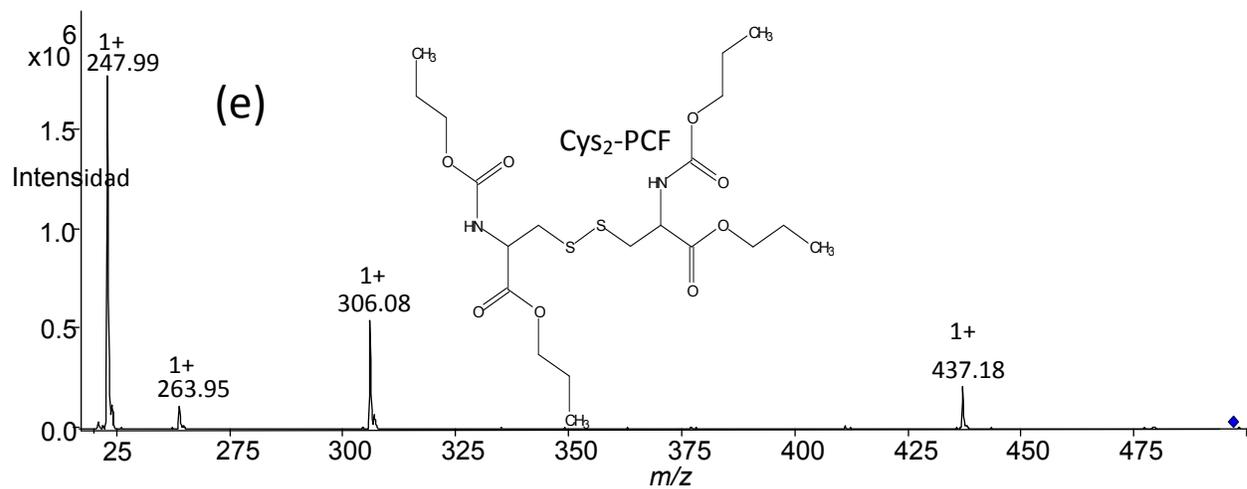
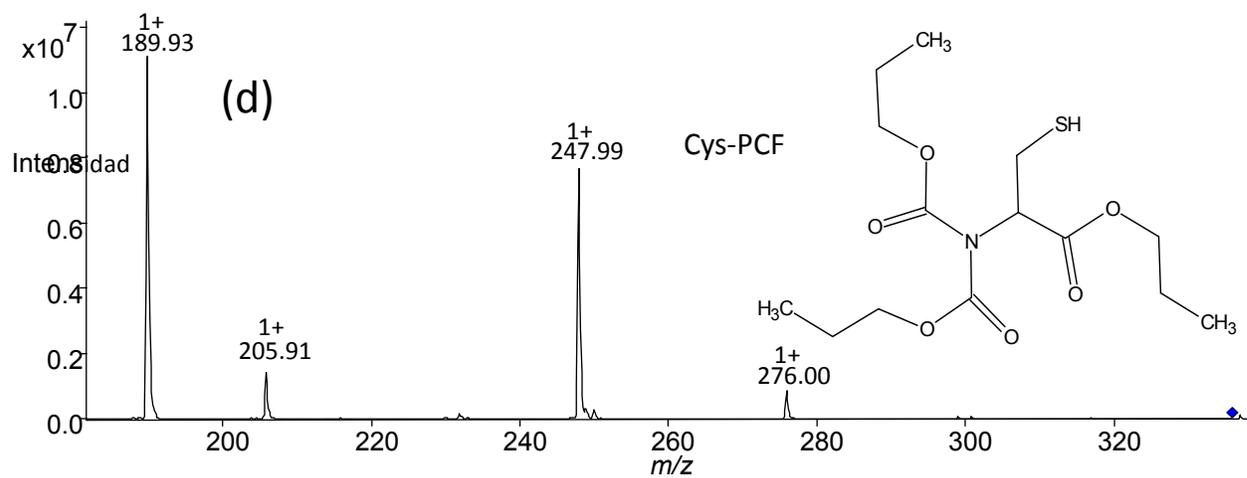
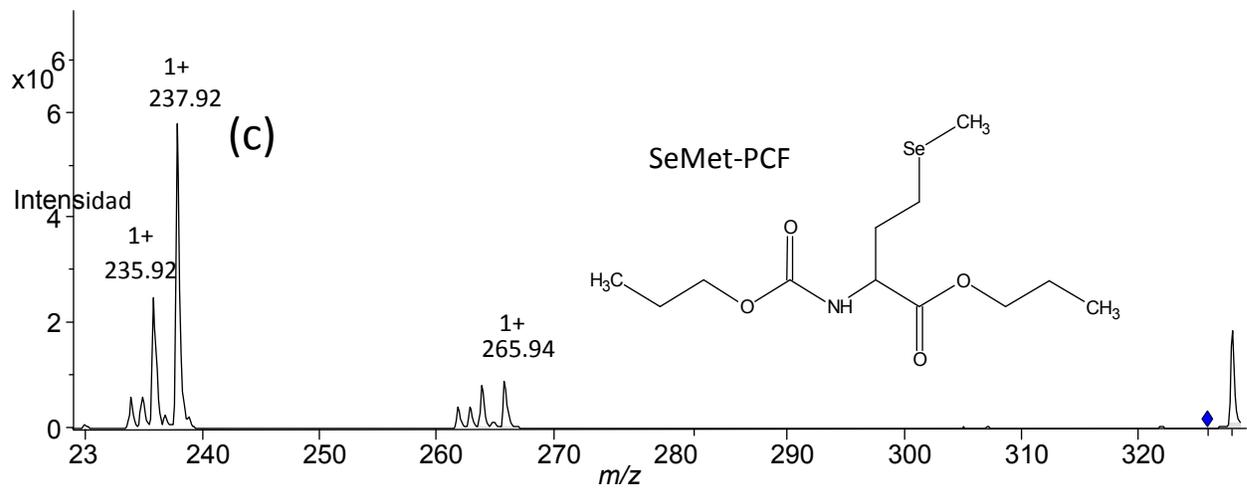


Figura 11. Espectros de masas adquiridos para (a) Met, (b) MeSeCys, (c) SeMet, (d) Cys, (e) Cys2 y (f) SeCys2. El patrón de isótopos característico de Se se muestra en el recuadro expandido

Hay que resaltar que la excepcional selectividad del método MRM es debida al uso de la transición ion precursor – ion producto que es única para un compuesto dado. Dicha transición permite también disminuir de manera drástica el ruido aumentando la relación S/N.

A continuación, se obtuvieron espectros de fragmentación de los iones precursores; mismos que se presentan en la Figura 12 junto con las estructuras de compuestos derivados. A partir de los espectros MS/MS, para cada uno de los compuestos se eligió uno o más iones de mayor intensidad posible para utilizarlos como iones cuantificadores con alta especificidad y sensibilidad.





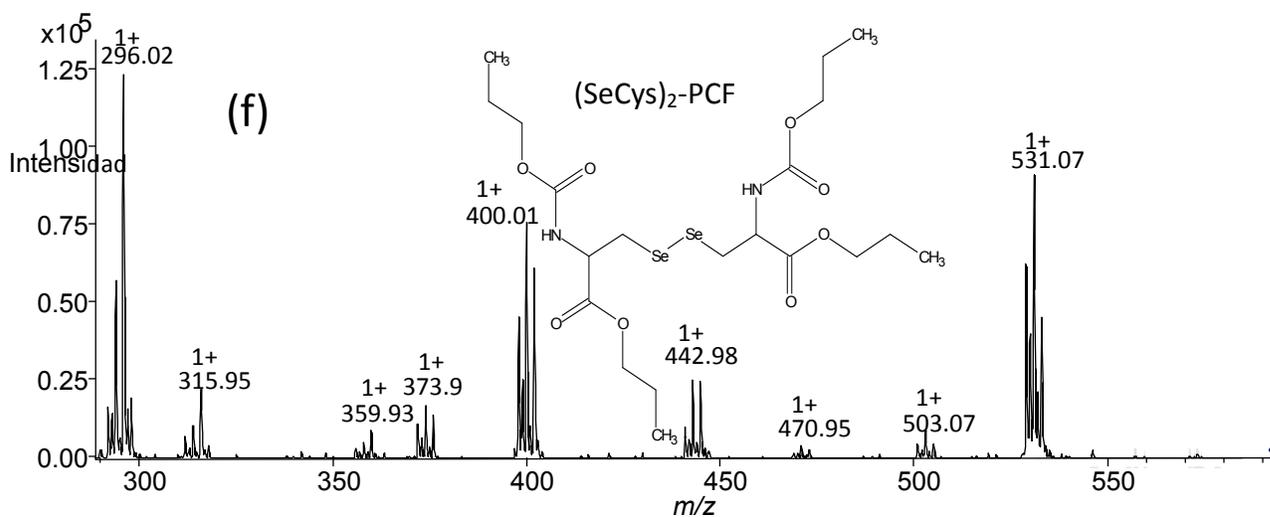


Figura 12. Espectros de MS/MS de cada uno de los estándares de aminoácidos obtenidos a partir

Un parámetro importante de establecer fue la energía de fragmentación para la obtención del mayor valor de relación S/N del ion producto (cuantificador). Los iones de fragmentación de mayor intensidad en espectros de fragmentación fueron considerados como los cuantificadores; estos fueron m/z 190, 209, 238, 190, 248 y 296 para Met, MeSeCys, SeMet, Cys, Cys₂ y (SeCys)₂, respectivamente. Se examinó de manera sistemática el efecto de la energía de fragmentación sobre la intensidad de estos los iones para todos los estándares derivatizados. Con base en estos resultados (Figura 13), se seleccionó la energía que arrojó el valor de S/N más alto y los valores de amplitud de fragmentación se enlistan en la Tabla 24.

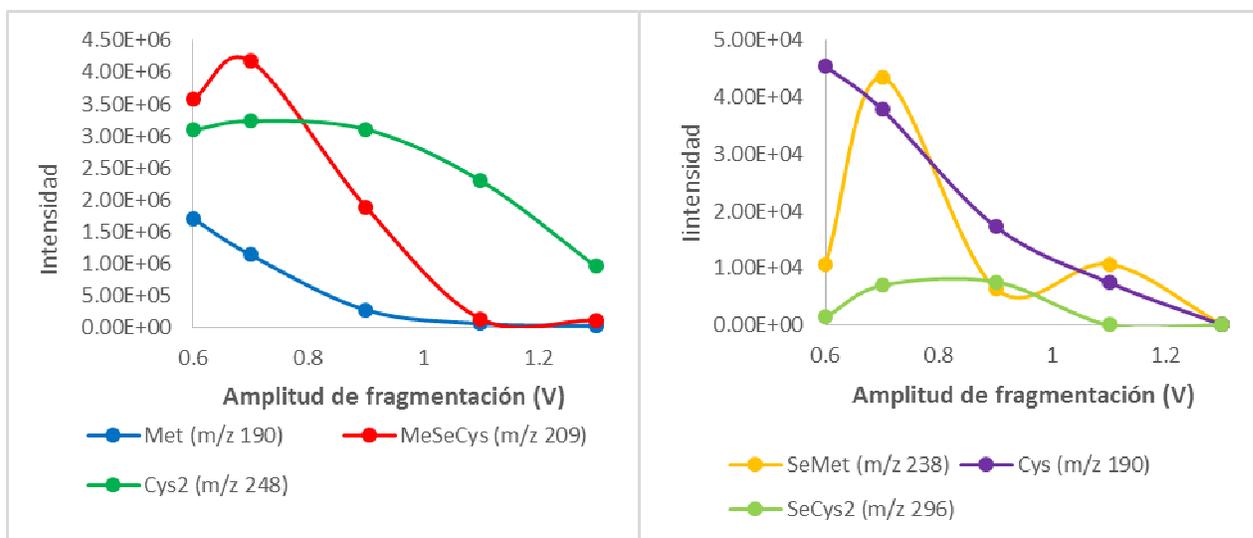


Figura 13. Gráfico que representa el efecto de la energía de fragmentación sobre la intensidad de las señales de los iones en el espectro de MS/MS.

A continuación, se definieron segmentos de tiempo para adquirir las señales correspondientes a los iones cuantificador/cualificador de para cada uno de los compuestos. Dichos segmentos, junto con las estructuras de los compuestos derivados obtenidos para Met, MeSeCys, SeMet, Cys, Cys₂ y (SeCys)₂ así como los valores *m/z* de iones precursores, cuantificadores y calificadores se resumen en la tabla 26 y 27.

Aunque el ion producto *m/z* 190 fue común para Met y SeMet, hay que recordar que los compuestos entran al detector másico en diferentes tiempos, correspondientes a sus tiempos de retención en la separación cromatográfica, lo que permite separar eventos de su fragmentación, evitando conflictos.

Tabla 24. Condiciones instrumentales para el análisis de aminoácidos por ESI-IT-MS en el modo Full Scan.

amaZon SL ESI-IT-MS		
Columna	Phenomenex Luna C18 (15 x 2 mm, tamaño de partícula 3 μm)	
Temp. de columna	35 °C	
Fase Movil	Formiato de amonio 5 Mm a pH 3.5 (A) : CH ₃ CN (B)	
Volumen de inyeccion	20 μL	
Flujo	0.3 mL/min	
Programa de gradiente	Tiempo, (min)	% B
	-3	60
	0	60
	10	65

	11	98
	12	60
	10	98
	12	35
Modo	positivo	
Voltaje de spray	4500 V	
voltaje de placa	500 V	
Rango de m/z	150 - 650	
Presión del gas de nebulizador	15 psi (N ₂)	
Gas de secado	8 L/min (N ₂)	
Temperatura de la fuente	220 °C	

Tabla 25. Condiciones Instrumentales para el MRM dividido en segmentos y sus respectivos tiempos de retención de cada aminoácido.

Segmentos	Compuesto	Tiempo del segmento (min)	Tiempo de retención (min)	Amplitud de fragmentación (V)	Ventana de m/z	cut-off (m/z)
1	-	0 – 5.1	-	-		-
2	Met, MeSeCys	5.1 – 6.5	6.1, 6.2	0.7	4.0	105
3	Se-Met	6.5 – 8.1	6.7	0.7	4.0	100
4	Cys	8.1 – 10.0	9.1	0.6	4.0	110
5	Cys ₂	10.0 – 11.0	10.6	0.7	4.0	135
6	SeCys ₂	11.0 – 11.6	11.1	0.9	4.0	180
7	-	11.6 – 12.0	-	-		-

El programa óptimo de elución para el modo MRM fue de la siguiente manera: de 0 a 1 min se aplicó un gradiente lineal de 35% a 60% de B; 1-8 min se mantuvo el porcentaje de 60% de B; 8 a 9 min gradiente lineal de 60% a 98% de B; 9-10 min se mantuvo en 98% de B; 10-12 min regreso a 35% de B; finalmente, se mantuvo 3 min con 35% de B con el objetivo de reequilibrar la columna. Y las condiciones instrumentales para el análisis de Met, MeSeCys, Se-Met, Cys, Cys₂ y (SeCys)₂ se dan en la Tabla 24.

Las condiciones instrumentales establecidas para el modo MRM se emplearon para el análisis de un mix de estándares; el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 14, donde queda clara la factibilidad de la detección/cuantificación de los seis compuestos de interés en una corrida con alta selectividad y muy bajo ruido.

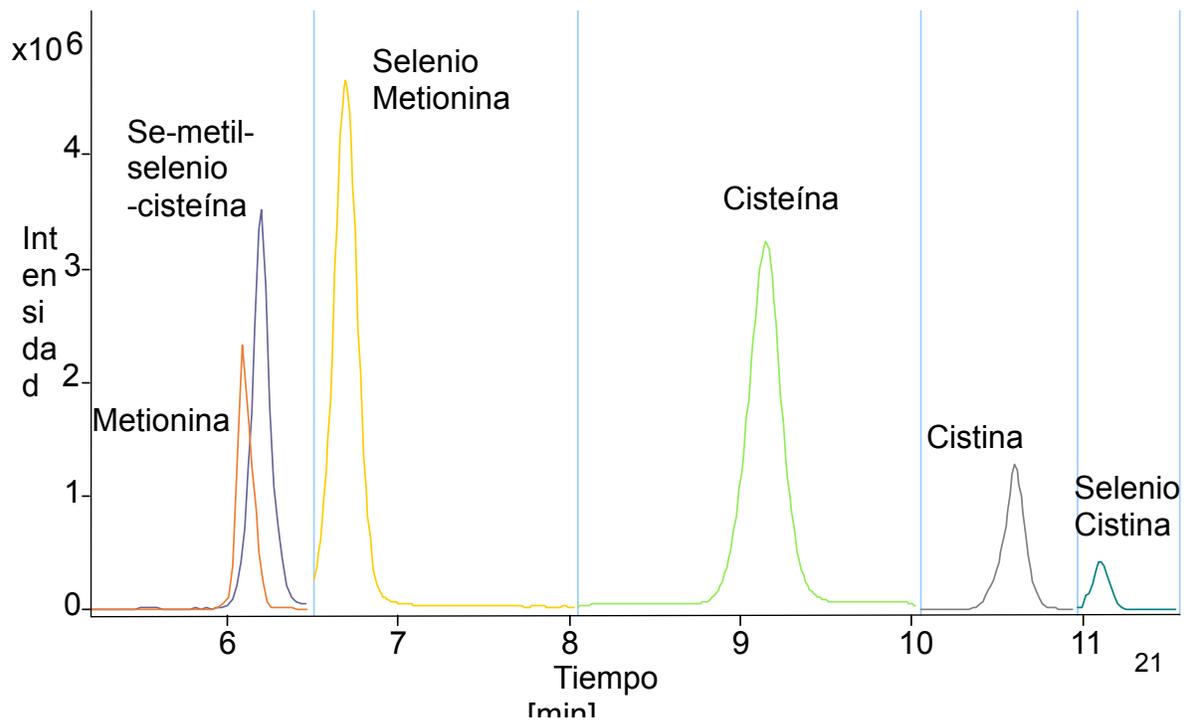


Figura 14. Cromatograma de una solución de estándares de aminoácidos (500 $\mu\text{g/L}$ de cada compuesto) en modo MRM.

Tabla 26. Estructuras moleculares de Se-aminoácidos derivatizados, sus masa nominal (M) y con sus respectivos valores m/z para iones precursor, iones cuantificadores y calificadores

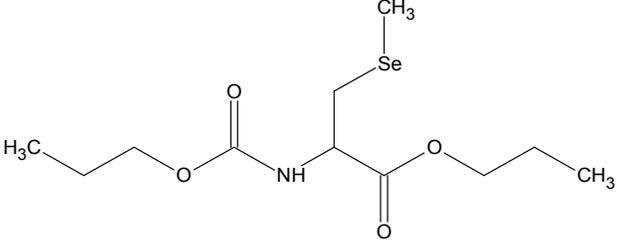
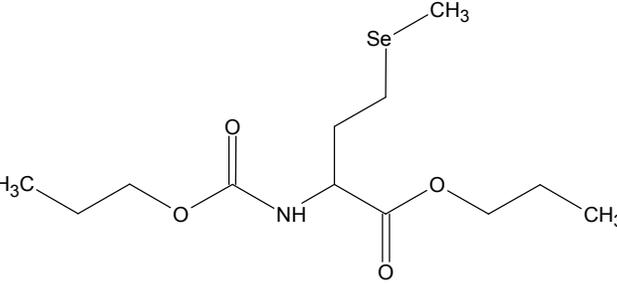
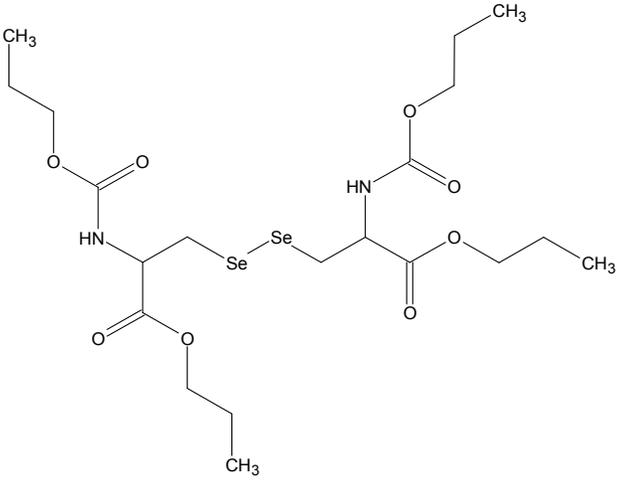
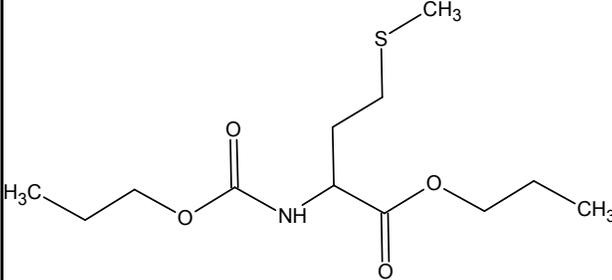
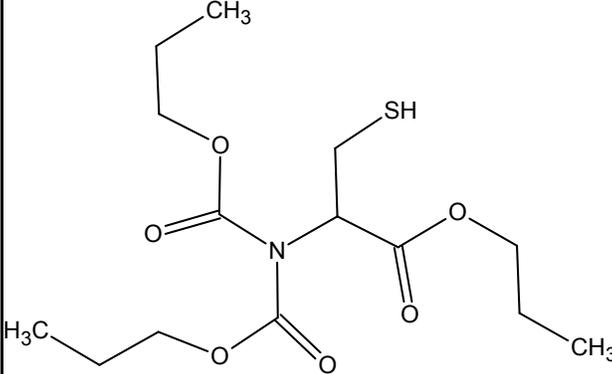
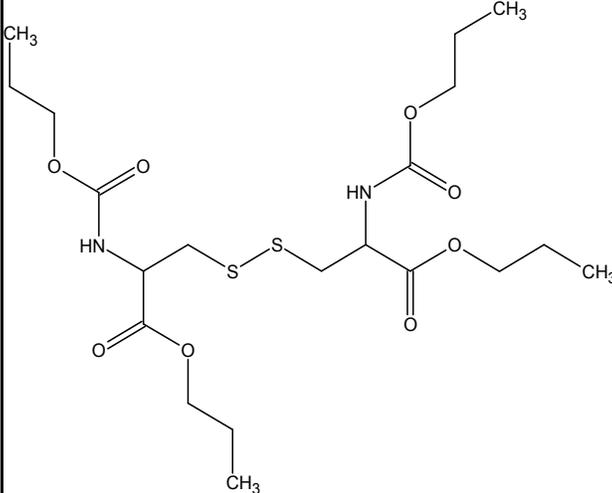
Compuestos	Estructura	MM	Precursor	ión cuantificador	ión calificador
MeSecys		182	312	209	224
SeMet		196	326	238	264
SeCys₂		334	593	296	531

Tabla 27. Estructuras moleculares (Derivatizadas) de Se-aminoácidos, sus masas nominal (M) y sus respectivos valores de m/z para iones precursores, ion cuantificador y ion calificador

Compuestos	Estructura	MM	Precursor	ión cuantificador	ión calificador
Met		149	278	190	218
Cys		121	336	190	248
Cys ₂		240	497	248	306

4.7.2.3 Calibración

La cuantificación de cada especie se llevó a cabo mediante el método de calibración externa utilizando 7 niveles de concentración cuyos valores fueron de 0, 10, 25, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ solo para las especies de Se. Los cromatogramas adquiridos en el modo MRM de las siete soluciones de calibración se presentan en la Figura 15; de nuevo hay que notar que en cada segmento, el ruido fue prácticamente inexistente. En el proceso de calibración se tomó el área de los picos cromatográficos como señal analítica, utilizando la plataforma QuantAnalysis, de Bruker. Las funciones de calibración se obtuvieron por el método de regresión lineal y los resultados se presentan en la tabla 28.

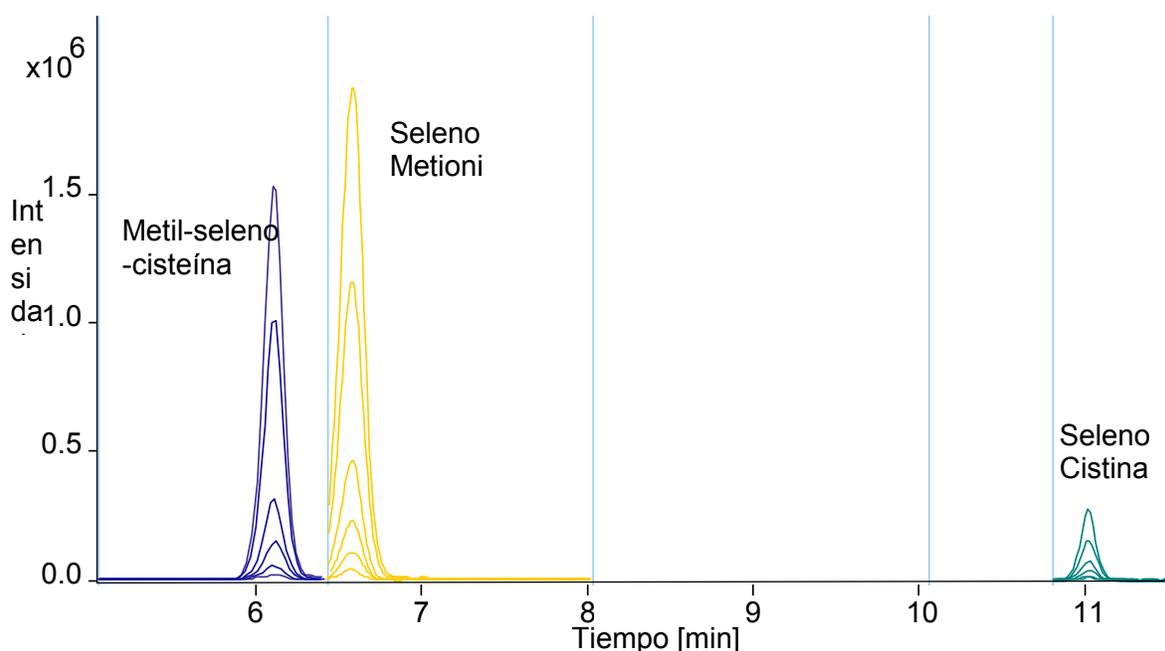


Figura 15. Cromatogramas MRM correspondientes a curva de calibración utilizando las concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los compuestos de selenio.

Tabla 28. Ecuaciones de regresión lineal obtenidos para tres compuestos de selenio por HPLC-ESI-ITMS/MS en el modo MRM; “y” es la señal analítica definida con el área de pico del analito y “x” es la concentración en mg L^{-1} del analito.

Compuesto	Tiempo de retención	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LC, $\mu\text{g L}^{-1}$	Ecuación	R ²
MeSeCys	6.2	65	218	$y = 26620x - 102222$	0.9997
SeMet	6.7	47	156	$y = 30968x + 102735$	0.9992
SeCys ₂	11.1	60	199	$y = 3384x + 40257$	0.9987

4.7.2.4 Determinación de Se-compuestos y aminoácidos en plantas por HPLC-ESI-IT-MS/MS

Al realizar el análisis de los extractos acuosos de la muestra control y del cultivo expuesto a 5 mg Se L^{-1} , la cistina fue el único aminoácido de las 6 especies buscadas que se encontró. En la figura 16 se presentan los respectivos cromatogramas MRM de estas muestras, donde la única señal aparece en el segmento de la cistina (10.0 – 11.0 min).

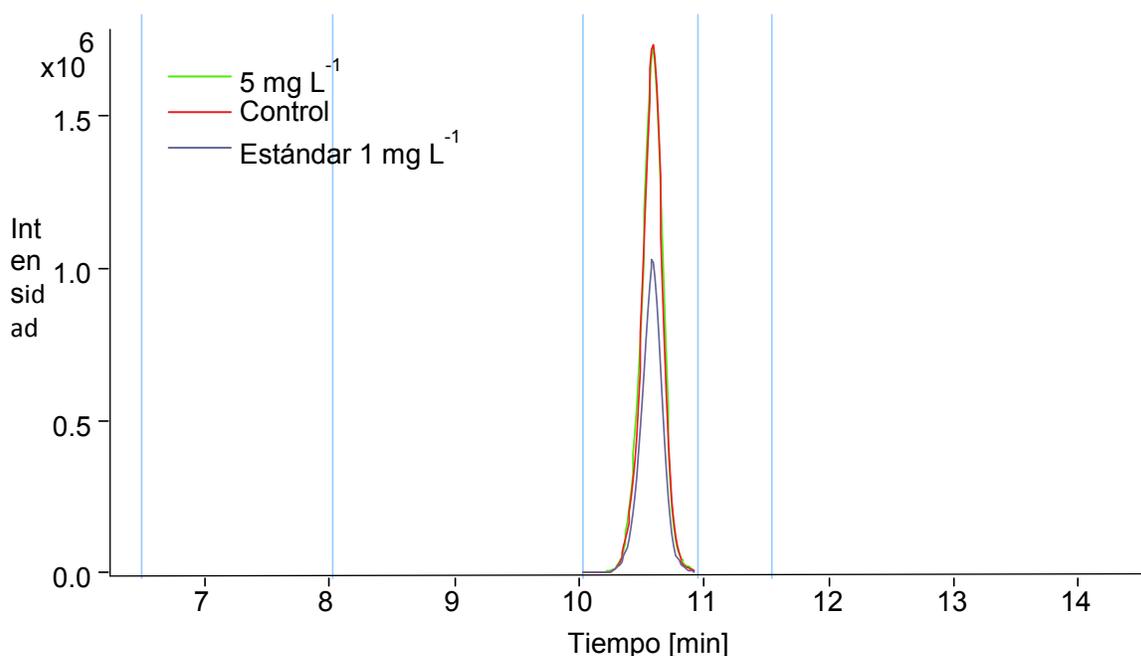


Figura 16. Cromatograma EIC correspondiente al ion cuatificador 247.99 m/z del precursor Cistina de 497 m/z.

De esta manera se demostró la factibilidad del procedimiento propuesto, basado en la derivatización con PCF y análisis por HPLC-ESI-MS/MS en modo MRM, para la cuantificación de Se-compuestos en la fracción de metabolitos libres (S2); sin embargo, las concentraciones de las especies en muestras reales fueron demasiado bajas respecto a la capacidad de detección del dicho procedimiento por lo que en un estudio futuro es necesario diseñar y aplicar una etapa de preconcentración.

Cabe señalar que, con base en el esquema de fraccionamiento representado en la Figura 4 se tienen dos opciones de preconcentración; en la primera de ellas, la fracción S2 se evapora a sequedad con posibilidad de disminuir el volumen para resuspender con los reactivos de derivatización y la segunda opción se refiere al

extracto acuoso que es liofilizado y podría ser reconstituido en un menor volumen de la fase móvil.

Además de bajas concentraciones de las especies de Se, debido a la gran variedad de metabolitos que se pueden extraer con agua, se pueden presentar interferencias de ionización que provocan baja magnitud de las señales analíticas.

Como una alternativa y complemento al sistema HPLC-ESI-ITMS/MS, se intentó caracterizar compuestos de Se (incluyendo aquellos desconocidos) mediante separación en una columna capilar en acoplamiento con un espectrómetro de masas de alta resolución (capHPLC-ESI-QTOF-MS).

4.8 Análisis de extractos de cultivos vegetales por capHPLC-ESI-QTOF-MS

El acoplamiento capHPLC-ESI-QTOF-MS y MS/MS ofrece grandes ventajas, incluyendo la posibilidad de preconcentrar/limpiar la muestra en una trampa pre-columna, una alta resolución tanto del sistema separativo como del analizador de masas; la fidelidad isotópica, exactitud de masa y fragmentación de iones. Todas estas posibilidades son de gran ayuda en la identificación de compuestos.

En este trabajo, para el análisis por capHPLC-ESI-QTOF-MS se realizó el mismo tratamiento de muestra y derivatización descrito anteriormente para HPLC-ESI-ITMS.

4.8.1 Condiciones instrumentales

El espectrómetro de masas fue un modelo maXis impact ESI-QTOF-MS, el cual fue acoplado a un cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 RLSCnano operado por el software Hystar 3.2 (Thermo Scientific Dionex). Las condiciones instrumentales se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Condiciones cromatográficas e instrumentales del sistema capHPLC-ESI-QTOF-MS

maXis impact ESI-QTOF-MS, Ultimate 3000 RLSCnano			
Trampa capilar	Zorbax 300SB 5 x 0.3 mm, 5µm		
Columna capilar	Zorbax 300Extend-C18 Capilar 0.3 X 150 mm 3.5 µm		
Fases Móviles	Acido fórmico 0.1 % (A) : CH ₃ CN (B)		
Programa de trampa	15 uL/min, 10% de CH ₃ CN, 2 min		
	Tiempo (min)	% B	
Programa de elución	1	-3	30
	2	0	30
	3	0	30
	4	30	85
	5	32	98
	6	34	98
	7	34.5	30
	8	35	30

	flujo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$
Modo	Positivo
Voltaje de spray	4500 V
Rango de m/z	80 - 800
Energía de colisión	20 eV
Presión del gas de nebulizador	0.4 bar (N_2)
Gas de secado	4 L/min (N_2)

Una importante parte del análisis por MS es un adecuado ajuste del eje de masas. Dicha calibración de masas se puede realizar con cualquier mezcla de compuestos de masas exactas conocidas que cubran todo el rango de valores m/z adquiridos en un análisis dado. Típicamente, se usa una sustancia capaz de formar clusters o aductos (dímeros, trímeros, etc.) en la fuente de ionización, tal es el caso de Csl o HCOONa. El formiato de sodio ha sido utilizado en este trabajo; cabe resaltar que las mezclas mencionadas son especialmente interesantes porque permiten la calibración tanto en el modo de ionización negativo como en el positivo. También es conocida la mezcla de polietilenglicoles, aunque resulta más compleja su preparación. El calibrante, puede ser introducido de manera continua adquiriendo su espectro a lo largo del cromatograma, lo que permite corregir por las fluctuaciones en la medida de la masa debidas a las pequeñas variaciones de los parámetros como la temperatura, que pueden dilatar o contraer el tubo de tiempo de vuelo. El calibrante, denominado “lock mass” y se adiciona post-columna, mediante el uso de una vía de dos entradas, o bien mediante el uso de fuentes modificadas, como lock spray o dual sprayer. La masa exacta teórica y adquirida experimentalmente se usan para corregir/recalcular el valor de todas las masas obtenidas durante la adquisición, en esta ocasión para el equipo utilizado se manejó el sistema de lock mass. En esta ocasión, como lock mass se utilizó metil estearato con una m/z 299.2945. Los espectros fueron obtenidos con una velocidad de adquisición de 1 Hz, en donde el rango de masa (80 –800 m/z) fue seleccionado en base a las masas de los Se-aminoácidos y aminoácidos derivatizados. La obtención de espectros MS/MS se aplicó durante toda la adquisición de manera automática. La energía de colisión fue de 20 eV.

4.8.2 Resultados y discusión

En la Figura 17 se presentan los cromatogramas de iones extraídos a partir de un cromatograma de la mezcla de estándares; los picos fueron asignados a los compuestos con base a sus tiempos de retención y sus respectivas masas exactas (comparando con masa teórica). Los datos de espectros de masas obtenidos se muestran en la Figura 18; comparando los patrones isotópicos experimentales y teóricos de los estándares de aminoácidos analizados; la mezcla se preparó con una concentración de 0.5 mg L^{-1} de cada compuesto

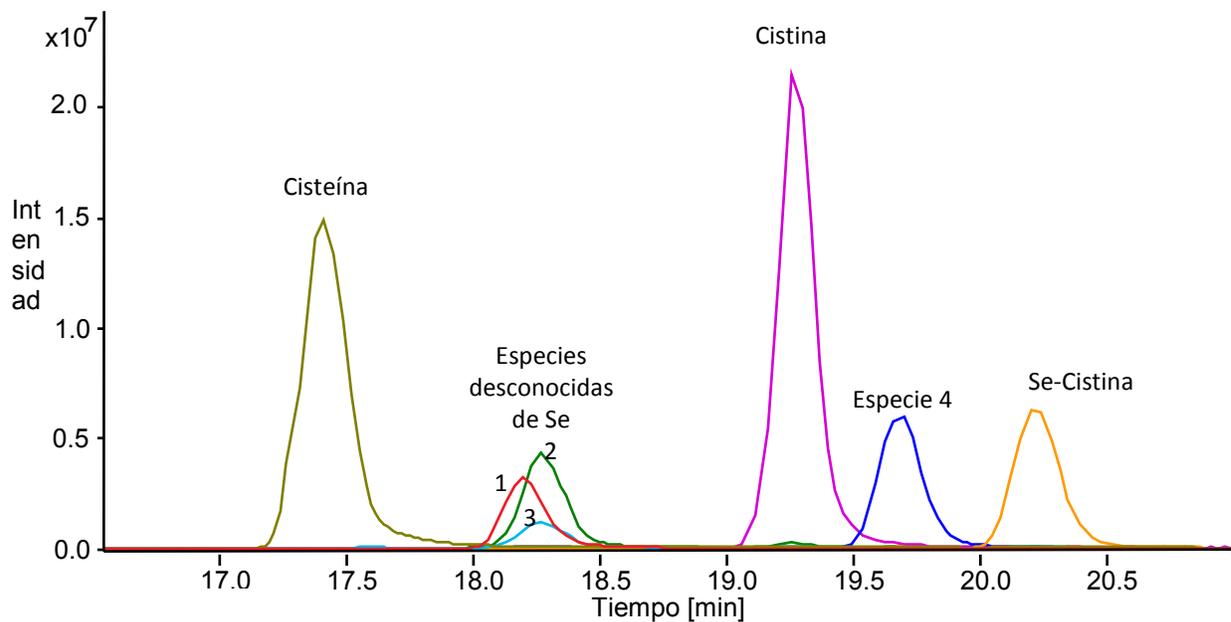


Figura 17. Cromatogramas de iones extraídos de una mezcla de estándares, analizada en el sistema capHPLC-ESI-QTOFMS (0.5 mg/L de cada compuesto).

En la tabla siguiente se presentan las formulas moleculares, masas y tiempos de retención de todas las especies de aminoácidos y Se-aminoácidos derivatizados que se lograron identificar de la solución de estándares.

Tabla 30. Compuestos derivatizados de la solución de estándares.

Compuestos (Derivatizados)	Formula Molecular	Precursor (m/z)	TR (min)
Cisteína	$C_{14}H_{25}NO_6S$	336.1541	17.4
Especie 1	-	384.0989	18.2
Especie 2	-	513.1802	18.3
Especie 3	-	529.1751	18.3
Cistina	$C_{20}H_{36}N_2O_8S_2$	497.2078	19.3
Especie 4	-	545.1530	19.7
Se-Cistina	$C_{20}H_{36}N_2O_8Se_2$	593.0985	20.2

Como se muestra en la Figura 19 se detectaron algunas otras especies desconocidas de la solución de estándares las cuales se produjeron a partir de la reacción de derivatización con PCF.

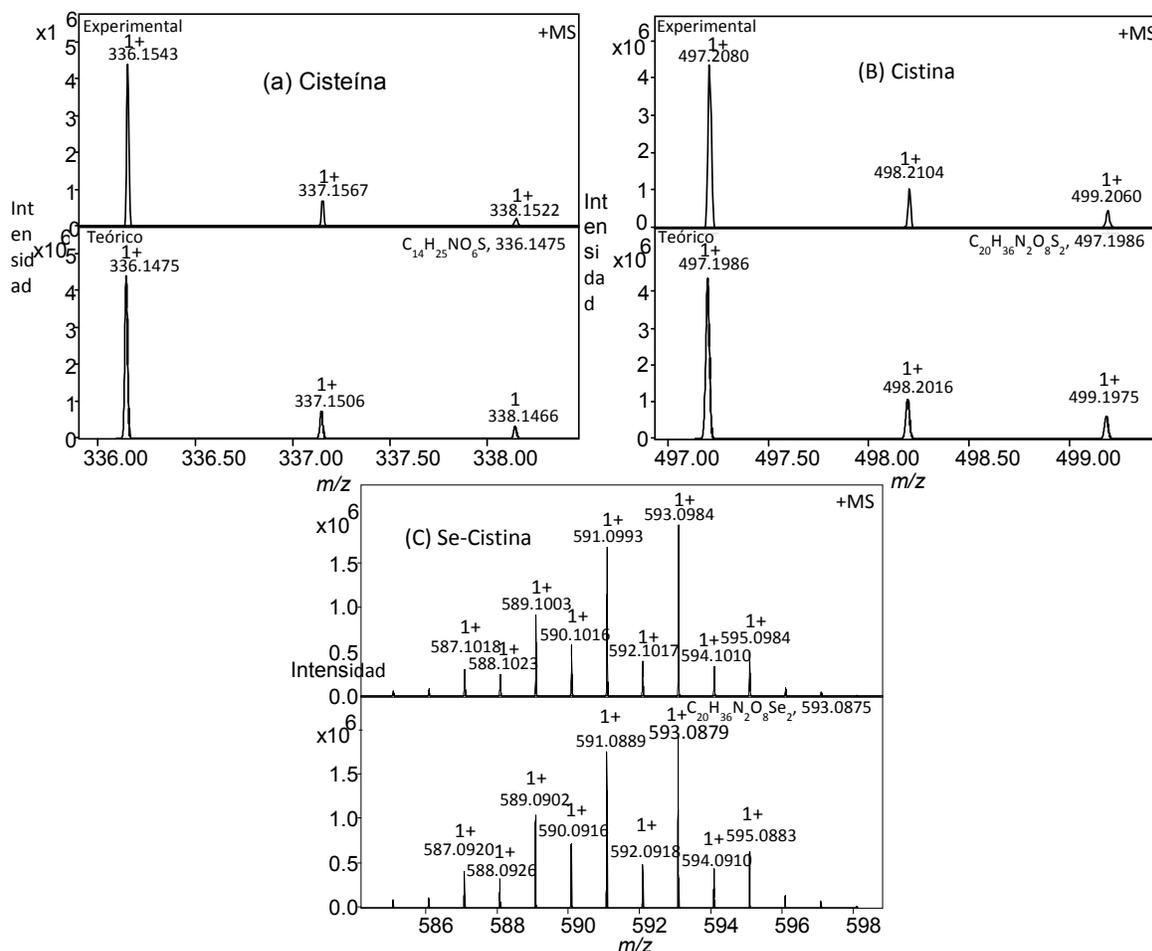


Figura 18. Patrones isotópicos experimentales y teóricos de los estándares de aminoácidos analizados por ESI-QTOF-MS: (a) Cys; (b) Cys₂; (c) SeCys₂.

Aparte de los Selenocistina confirmada en la solución de estándares por medio del acoplamiento capHPLC-ESI-QTOF-MS, se observó la formación de cuatro compuestos provenientes del proceso de derivatización, sus espectros masas tienen presente el patrón isotópico característico del selenio las m/z de los iones monoisotópicos son: 384.0989, 513.1802, 529.1751 y 545.1530 nombradas como especie 1, especie 2, especie 3 y especie 4, respectivamente. Dichas especies se marcan en la Figura 17 y sus respectivos padrones isotópicos se muestran en la Figura 19. En la Tabla 30 se resumen los tiempos de retención de cada uno de estas especies desconocidas formadas a partir de la solución de estándares.

Para una correcta caracterización de especies de selenio desconocidas es necesario identificarlas cada una de ellas, esto para poder realizar de una manera correcta el análisis en los extractos de germinados.

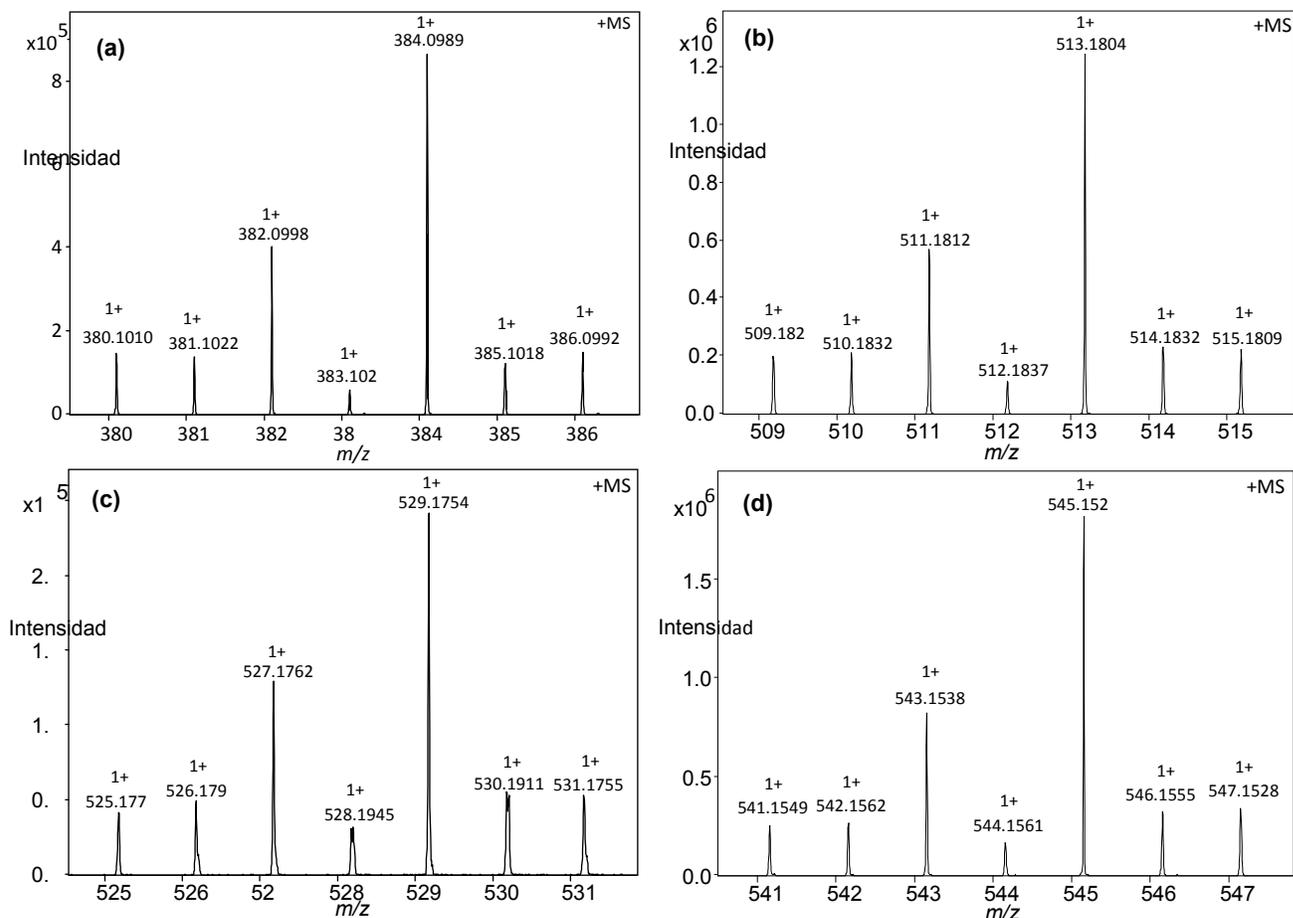


Figura 19. Patrones isotópicos experimentales de las especies de selenio desconocidas encontradas por capHPLC-ESI-QTOF-MS.

4.8.3 Análisis metabolómico de extractos de alfalfa por capHPLC-ESI-QTOF

De manera de ejemplo, en la Figura 20 se presentan los cromatogramas de pico base (BPC, intervalo de m/z 80 – 800) obtenidos en el análisis de extractos acuosos de germinados de alfalfa después de derivatización con PCF; se pueden apreciar similares picos cromatograficos al comparar la muestra control contra el tratamiento 5.0 mg Se L^{-1} durante todo el programa de elución. Por otro lado sin embargo, se notan diferencias entre las abundancias de varios picos, sugiriendo que Se(IV) tiene un impacto sobre la síntesis de metabolitos de la planta que son susceptibles a la reacción con PCF.

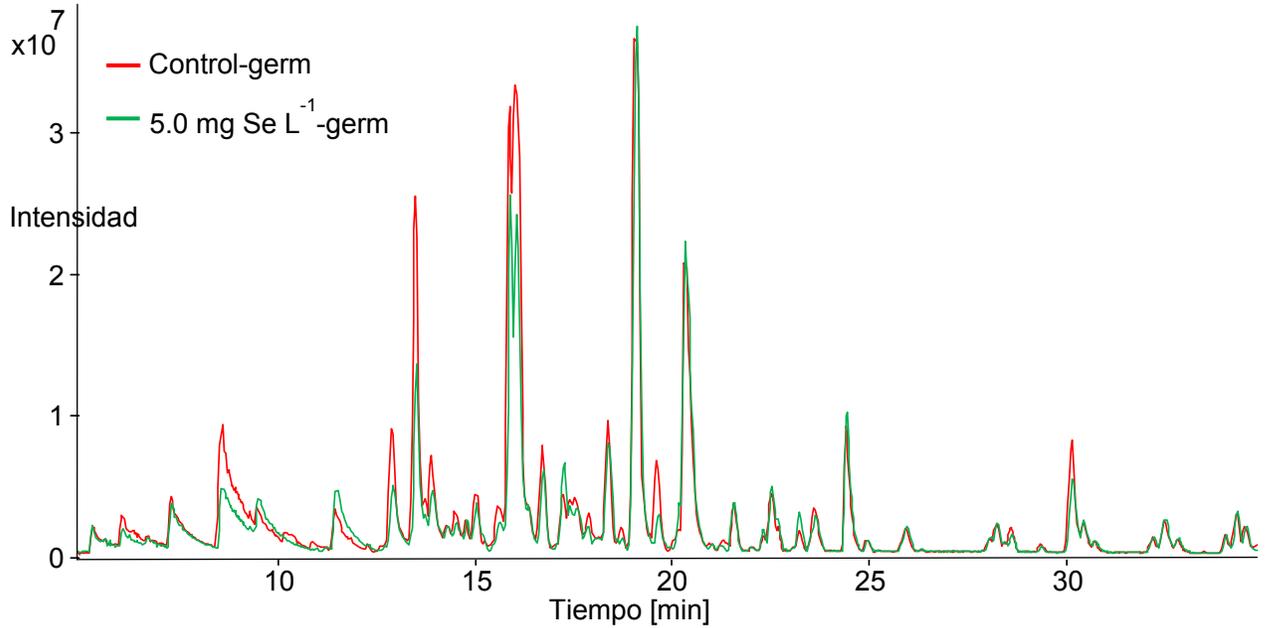


Figura 20. Cromatogramas capHPLC-ESI-QTOF-MS (BPC, m/z 80 – 800) de extractos acuosos de germinados de alfalfa obtenidos después de derivatización con PCF.

En la Figura 21 se presenta solamente la región de elución correspondiente a más notorias diferencias de abundancias de las señales entre el control y el tratamiento de 5.0 mg Se L⁻¹ en el medio de Hoagland. Dichas diferencias están en los siguientes tiempos de retención: 12.9, 13.6, 13.9, 15.9, 16.1 y 19.7 min. Para los picos mencionados se observó una disminución en su intensidad cuando la planta fue expuesta a Se (IV) a una concentración de 5.0 mg L⁻¹. Al contrario, se logró ver un pequeño aumento en el pico cromatografico con el tiempo de retención 17.3 min, este aumento en la intensidad se observó con el tratamiento de selenio en el medio Hoagland.

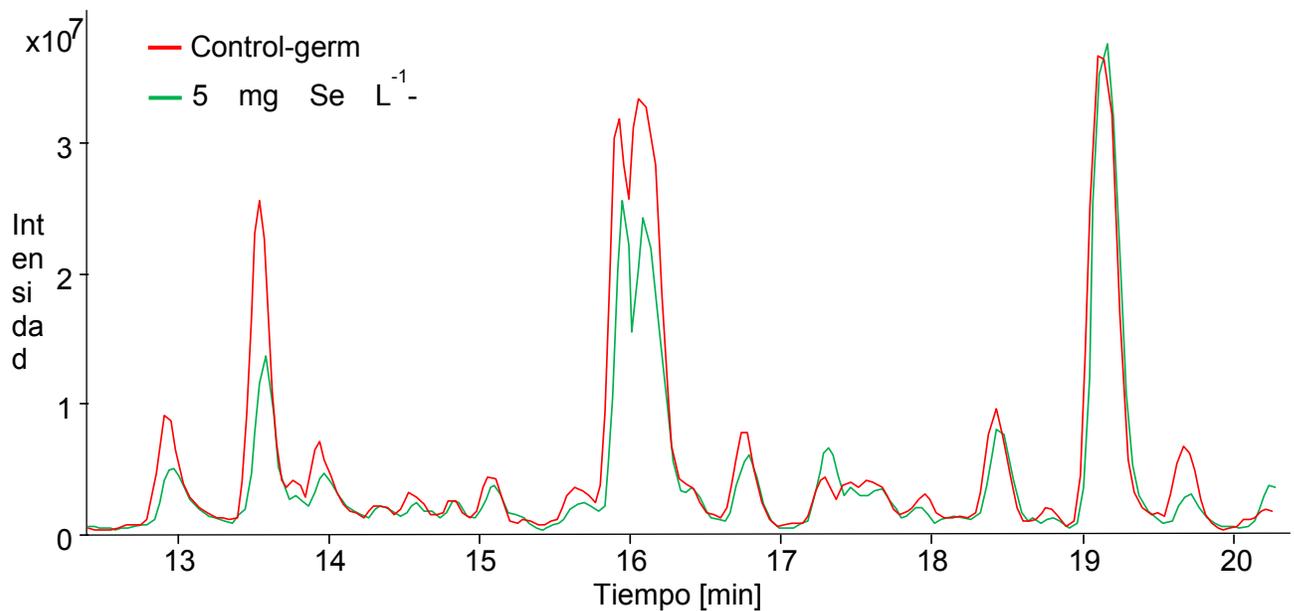


Figura 21. Cromatogramas capHPLC-ESI-QTOF-MS (BPC, m/z 80 – 800) de extractos acuoso de germinados de alfalfa; se presenta la región de elución con mayores diferencias entre intensidades de señales, entre control y tratamiento con Se.

Para confirmar los resultados obtenidos previamente por HPLC-ESI-ITMS en las mismas muestras, se obtuvieron cromatogramas de iones extraídos correspondientes a seis aminoácidos y Se-aminoácidos de interés. De la misma manera que en análisis por HPLC-ESI-ITMS, se logró identificar a la cistina en la muestra control y en el tratamiento con 5.0 mg Se L^{-1} . En la figura 22 se presentan cromatogramas EIC del ion m/z 497 que corresponde a la molécula protonada del aminoácido derivatizado con PCF, dichos cromatogramas fueron obtenidos para el extracto de alfalfa control y expuesto a Se(IV) y para el estándar de cistina. En la Figura 23, se presentan los padrones isotópicos de dicho ion.

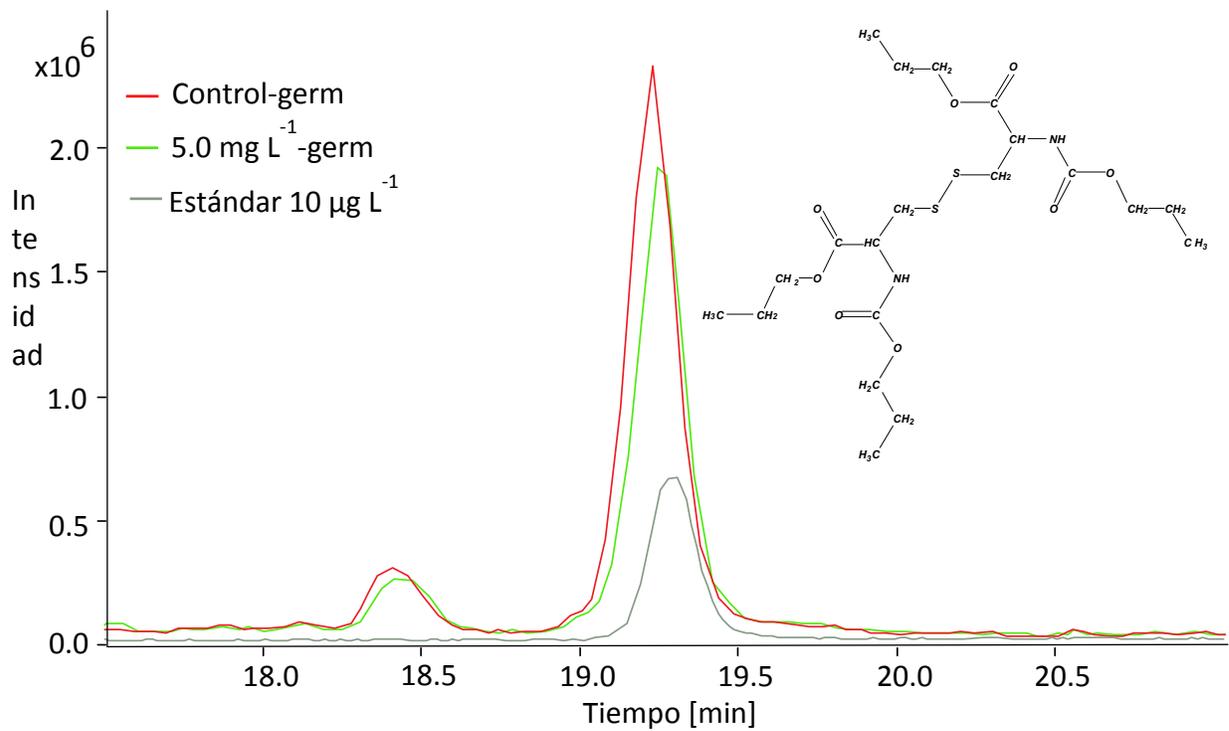


Figura 22. Cromatogramas EIC del ion m/z 497 correspondiente al a cistina, obtenidos en el sistema capHPLC-ESI-QTOF-MS

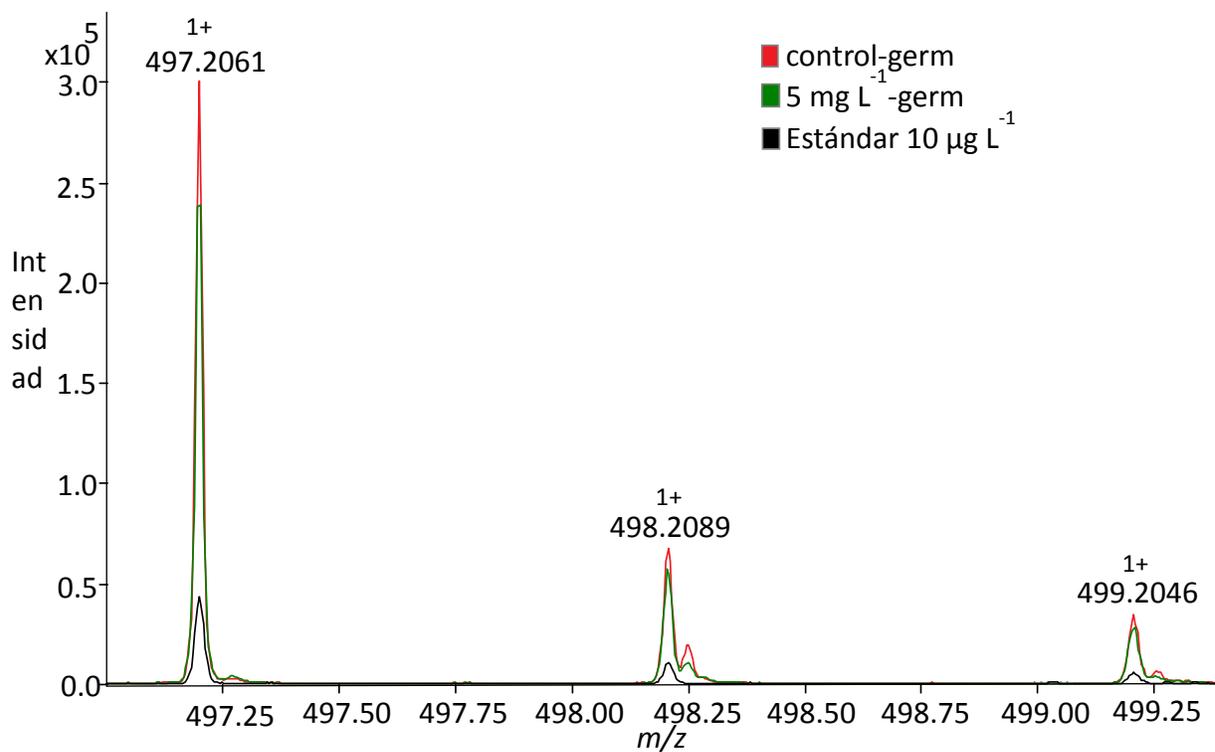


Figura 23. Padrones isotópicos de cistina derivatizada con PCF obtenidos en el análisis por capHPLC-ESI-QTOF-MS.

En cuanto al espectro de fragmentación del ion m/z 497, en la Figura 24, se presentan estructuras de los fragmentos correspondientes a los iones m/z 206.0519, 248.0995 y 306.0882 obtenidos en el análisis del estándar de cistina derivatizada. Por su parte, en la Figura 25, se presentan espectros de fragmentación del mismo ion m/z 497 obtenidos en el análisis de extractos de alfalfa (control y expuesto a 5 mg Se L-1).

La buena concordancia de tiempos de retención del estándar de cistina con el pico observado en EIC, buena concordancia de masa exacta, del padrón isotópico y de fragmentación, permiten confirmar de manera contundente la identidad del compuesto encontrado en los extractos de alfalfa como cistina.

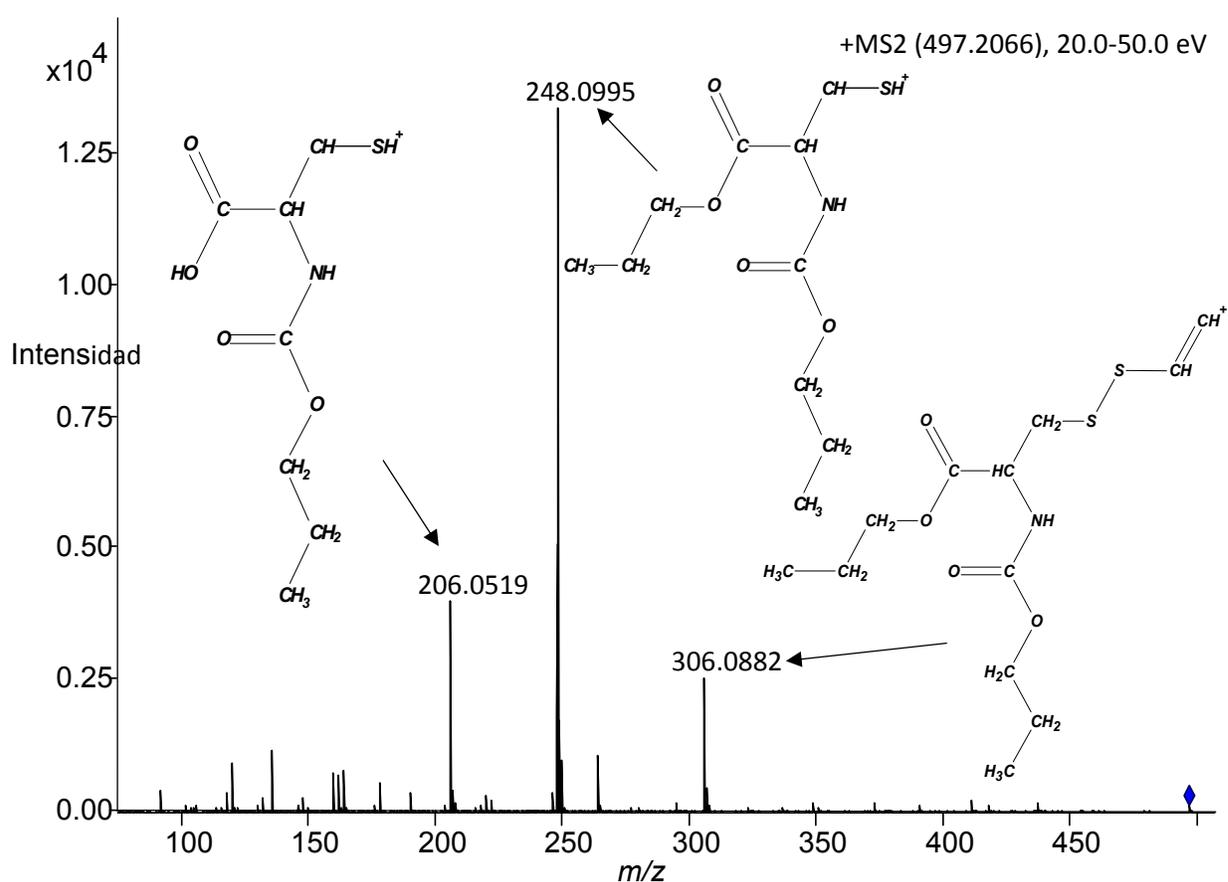


Figura 24. Espectro de fragmentación del ion m/z 497 adquirido para estándar de cistina a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ por ESI(+)-QTOF-MS/MS.

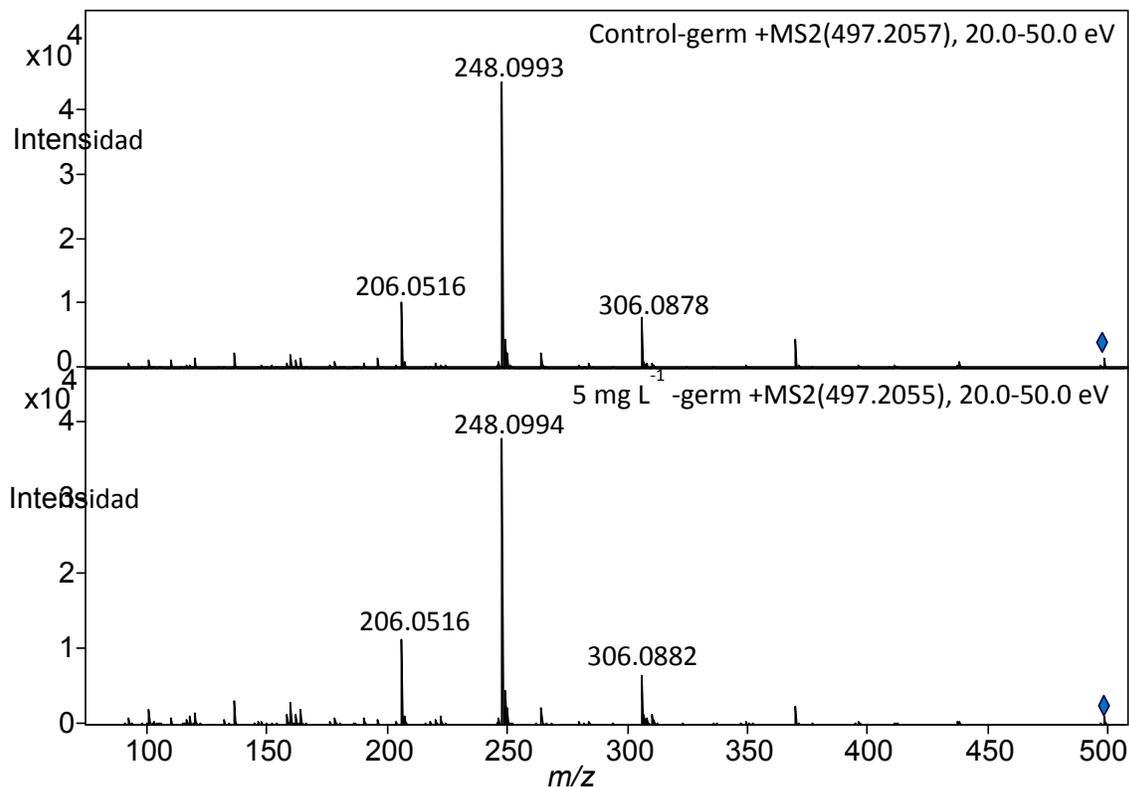


Figura 25. Espectros de fragmentación del ion m/z 497 (cistina derivatizada) obtenido para el cultivo control y expuesta a Se(IV), 5 mg Se L⁻¹ obtenidos por ESI(+)-QTOF-MS/MS.

Además de buscar a los aminoácidos y Se-aminoácidos directamente en los datos capHPLC-ESI-QTOF-MS, se aplicó el algoritmo “dissect” para comparar los perfiles de elución de una totalidad de compuestos. Como ya se mencionó al inicio de esta sección, la Figura 20 muestra cromatogramas de pico base, mientras que la figura 26 representa los datos después de aplicar dicho algoritmo. Cabe señalar que el software Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics) permite diferentes opciones de análisis de datos y de búsqueda de compuestos, donde el primer paso es la función de “dissect”. Este método encuentra compuestos en un cromatograma LC-MS incluso si los picos se superponen casi por completo, basándose en los tiempos de retención, posición del máximo de pico y su simetría para iones correspondientes a espectros MS y MS/MS. Como resultado, se crea una lista de m/z correspondientes a compuestos individuales, cada uno asignado a su tiempo de retención. En este trabajo, para el algoritmo “dissect”, se aplicó un valor mínimo de S/N 3.0 y un mínimo número de iones superpuestos de 5. Como resultado (Figura 26), se encontraron 164 posibles compuestos para la muestra control y 160 compuestos para la muestra expuesta a 5.0 mg Se L⁻¹ con claras diferencias entre ambos perfiles.

Las siguientes etapas de identificación consisten en la adquisición de los espectros MS/MS, búsqueda de la fórmula elemental y búsqueda de compuestos/estructuras en disponibles bases de datos. Siguiendo esta ruta, no se han encontrado compuestos de selenio; como ya se mencionó antes, en un estudio futuro sería necesario diseñar y aplicar la etapa de preconcentración y limpieza de muestra [87].

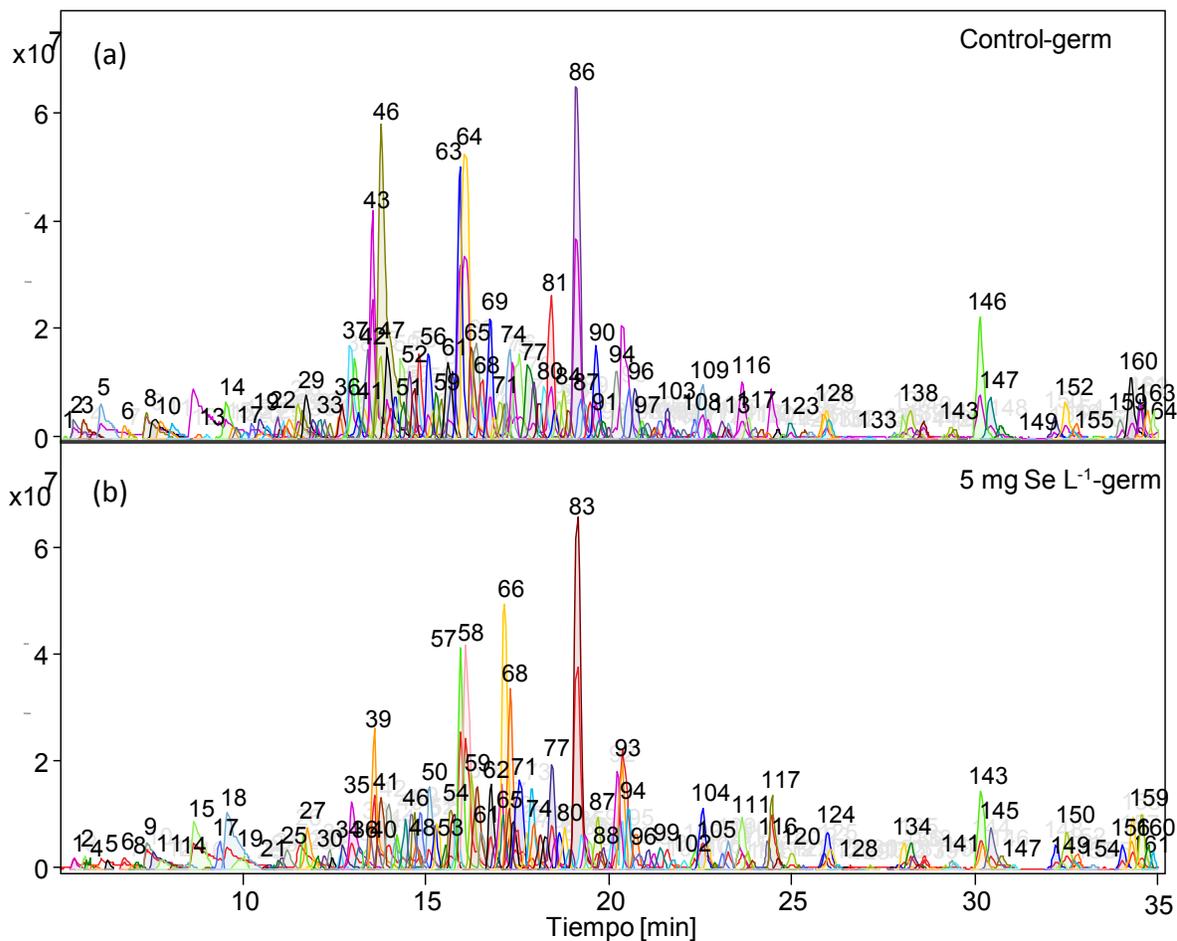


Figura 26. Los cromatogramas “dissect” obtenidos en el análisis de datos capHPLC-ESI-QTOF-MS: (a) Control y (b) 5 mg Se L⁻¹.

4.9 ANÁLISIS DE METABOLITOS DE INTERÉS EN NUTRICIÓN

Como se ha descrito en la parte introductoria a los germinados de alfalfa se les ha atribuido un gran valor nutricional no solo por su alto contenido de carbohidratos, proteínas y minerales, sino por ser una fuente de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y ciclitoles principalmente. Con el fin de evaluar el proceso de biofortificación con Se así como el valor nutricional de los germinados obtenidos, se realizó la comparación entre los perfiles metabolómicos de los brotes de alfalfa crecidos con Se (IV) respecto a los controles; para lo cual, se llevó a cabo un estudio metabolómico no dirigido mediante el uso de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica es una poderosa herramienta capaz de determinar una gran cantidad de metabolitos apolares, volátiles, semi-volátiles y termo-estables; el análisis de compuestos polares también es posible, pero requiere de un proceso de derivatización pre-columna que añade costo y tiempo al análisis, sin embargo, es necesario ya que proporciona a las moléculas el carácter apolar, la volatilidad, termo estabilidad y una mejora a la resolución, además de eliminar el coeluto de algunas sustancias polares. Todas estas características añadidas debido a la derivatización son necesarias para obtener una buena separación cromatográfica y posterior identificación de compuestos.

Aunando a lo anterior y dado que la mayoría de extracciones para estudios de metabolómica no dirigida se realizan con metanol al 80% donde una amplia gama de compuestos de diferente polaridad, volatilidad y reactividad son extraídos, es que se requiere realizar un proceso de derivatización previo al análisis por GC-MS. Para aumentar la volatilidad de los metabolitos, los grupos polares se pueden modificar mediante la adición de un grupo protector, minimizando así las interacciones dipolo-dipolo [88]. La sililación es el método de derivatización más frecuente, su propósito en cromatografía de gases es principalmente reducir la polaridad del analito, aumentar su estabilidad y mejorar el comportamiento en la GC [89, 90]. La reducción de la polaridad está asociada con el aumento de la volatilidad, y por esta razón, la sililación se utiliza con frecuencia para permitir el análisis por GC (o GC-MS) de compuestos que no pueden ser analizados por GC (como azúcares y aminoácidos) [89].

La sililación es la introducción de un grupo sililo en una molécula, generalmente en sustitución de hidrógeno activo [90]. Dentro de gran cantidad de reactivos de sililación, los dos grupos de protección más comúnmente usados son trimetilsililo (TMS) y terc-butildimetilsililo (TBDMS). Los derivados que contienen estos grupos protectores se pueden generar usando N,O-bis(Trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) o N-metil-N-(terc-butadimetilsilil) trifloriletoro (MTBSTFA) [88, 90]. Ambos

tipos de agentes de derivación reaccionan con una serie de grupos funcionales, aunque con una eficacia variable (figura 27).

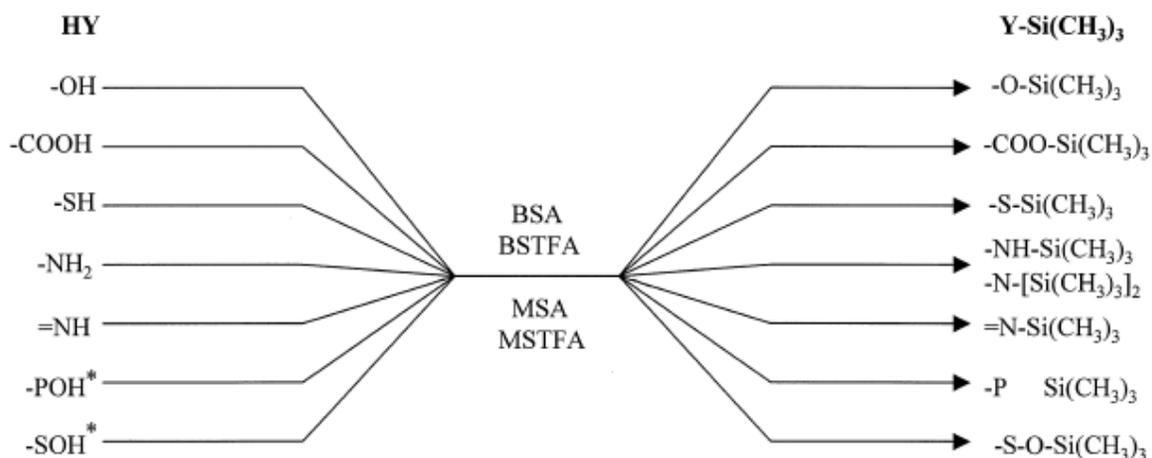


Figura 27. Grupos funcionales normalmente derivados por reactivos de sililación [91].

El reemplazo del hidrógeno activo por un grupo sililo reduce la polaridad del compuesto y reduce la formación de los enlaces de hidrógeno. Muchos compuestos de hidroxilo y amino considerados no volátiles o inestables a 200 - 300 ° C se han analizado con éxito en GC después de la sililación. Los derivados sililados son más volátiles y más estables y, por lo tanto, producen picos estrechos y simétricos [90].

La reacción de sililación es impulsada por un buen grupo saliente, lo que significa un grupo saliente con una baja basicidad, capacidad para estabilizar una carga negativa en el estado de transición, y poca o ninguna unión posterior entre el grupo saliente y el átomo de silicio. El mecanismo implica la sustitución de los hidrógenos activos (en los grupos -OH, -COOH, -NH, -NH₂ y -SH) por un grupo trimetilsililo. La sililación ocurre luego a través del ataque nucleofílico (S_N2), donde cuanto mejor es el grupo saliente, mejor es la sililación. Esto da lugar a la producción de un estado de transición bimolecular en el paso intermedio del mecanismo de reacción [88-90]. La reacción con BSTFA con un alcohol tiene lugar de la siguiente manera:

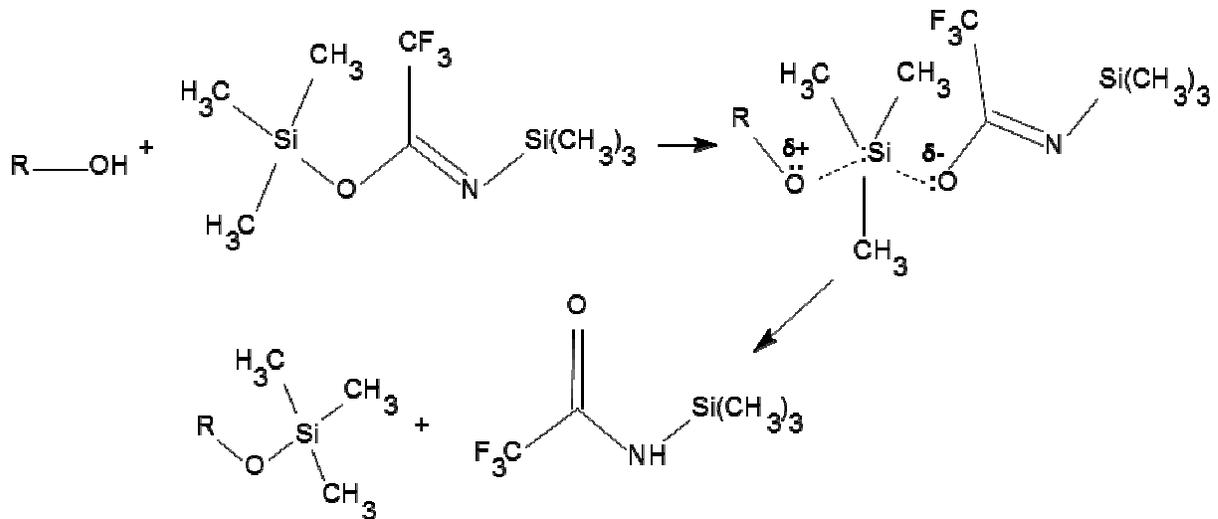


Figura 28. Derivatización de un hidrógeno activo con BSTFA [89].

En la derivación de la sililación, se debe tener cuidado para asegurar que tanto la muestra como los solventes estén secos. Los reactivos de sililación generalmente son sensibles a la humedad y deben almacenarse en recipientes herméticamente cerrados y por lo tanto, los disolventes utilizados deben ser tan puros como sea posible [90], ya que esto conducirá a la hidrólisis del reactivo BSTFA y evitará que cualquiera de los analitos seleccionados sean derivatizados. Por lo tanto, el agua debe ser eliminada antes de llevar a cabo la derivatización. En la sililación, la piridina es el disolvente más utilizado ya que es un solvente aprótico que elimina el ácido generado durante la reacción [90]. La facilidad de reactividad del grupo funcional hacia la sililación sigue el orden:

Alcohol > Fenol > Carboxilo > Amina > Amida / hidroxilo

Puede esperarse que la reacción se complete directamente dentro de la solución, pero la mezcla también se puede calentar durante 5 a 15 min a 60 ° C para asegurar que la reacción sea realmente completa o para evitar la descomposición del derivado antes del análisis de GC.

En cuanto a la evaluación de la calidad nutricional de germinados cultivados en presencia de Se(IV), se llevó a cabo un análisis de metabolómica no dirigido por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), después de la reacción de sililación; lo que nos permitió comparar el perfil metabólico de germinados biofortificados con Se (IV) respecto a controles crecidos sin este elemento.

4.9.1 Extracción de metabolitos o preparación de muestras

Se pesó 50 mg de biomasa liofilizada, se agregaron 700 μL de metanol al 80% y la mezcla se mantuvo por 24 hr a temperatura ambiente. Después, se mezcló con un vortex durante 1 min. La muestra fue sonicada por 2 hr a temperatura ambiente y centrifugada posteriormente a 10000 g durante 10 min, recuperando el sobrenadante el cual se evaporó a sequedad utilizando un speed vac a 60°C por 2 hr. La muestra se resuspendió en 350 μL de piridina, se agregó 50 μL N,O-bis(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida (*BSTFA*) y se calentó a 50°C durante 30 min. Una vez finalizada la derivatización, la muestra fue centrifugada a 10000 g durante 10 min y diluida 5 veces con piridina para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases. Las condiciones instrumentales se presentan en la Tabla 31.

Tabla 31. Condiciones instrumentales para el análisis de metabolitos en plantas por GC-MS.

Condiciones	Bruker SCION TQ MS		
Inyector	1 μL		
split	1:10		
Temp. de inyector	250 °C		
Flujo de gas acarreador	1 mL/min He		
Columna	DB-5MS; longitud de 30 m, 0.25 mm ID; 0.25 μm de recubrimiento.		
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
	-	80	2
	12	300	6
Tiempo total	26.33 min		
Temp. de fuente de ionización	250 °C		
Modo de adquisición	Full Scan		
Temp. de línea de transferencia	280 °C		
Rango de detección, <i>m/z</i>	50-500		

El tiempo total de la corrida cromatográfica fue de 26.33 min. En la Figura 29 y 30 se presentan los cromatogramas obtenidos correspondiente al TIC de todas las condiciones de germinación (0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg L^{-1}). Haciendo una comparación de los cromatogramas obtenidos de los diferentes tratamientos, a simple vista se pueden señalar diferencias en las intensidades de señales presentes en control y tratamientos con Se(IV), así como cambios en el perfil de elución de las señales entre los tratamientos; como ejemplo, en la Figura 30 se presenta la comparación entre los cromatogramas (TIC) obtenidos del control y de 0.5 mg L^{-1} ; en donde las intensidades de las señales obtenidas en el cromatograma correspondiente a 0.5 mg L^{-1} son claramente mayores respecto al control; así mismo en esta misma condición se observan señales diferentes al tratamiento control.

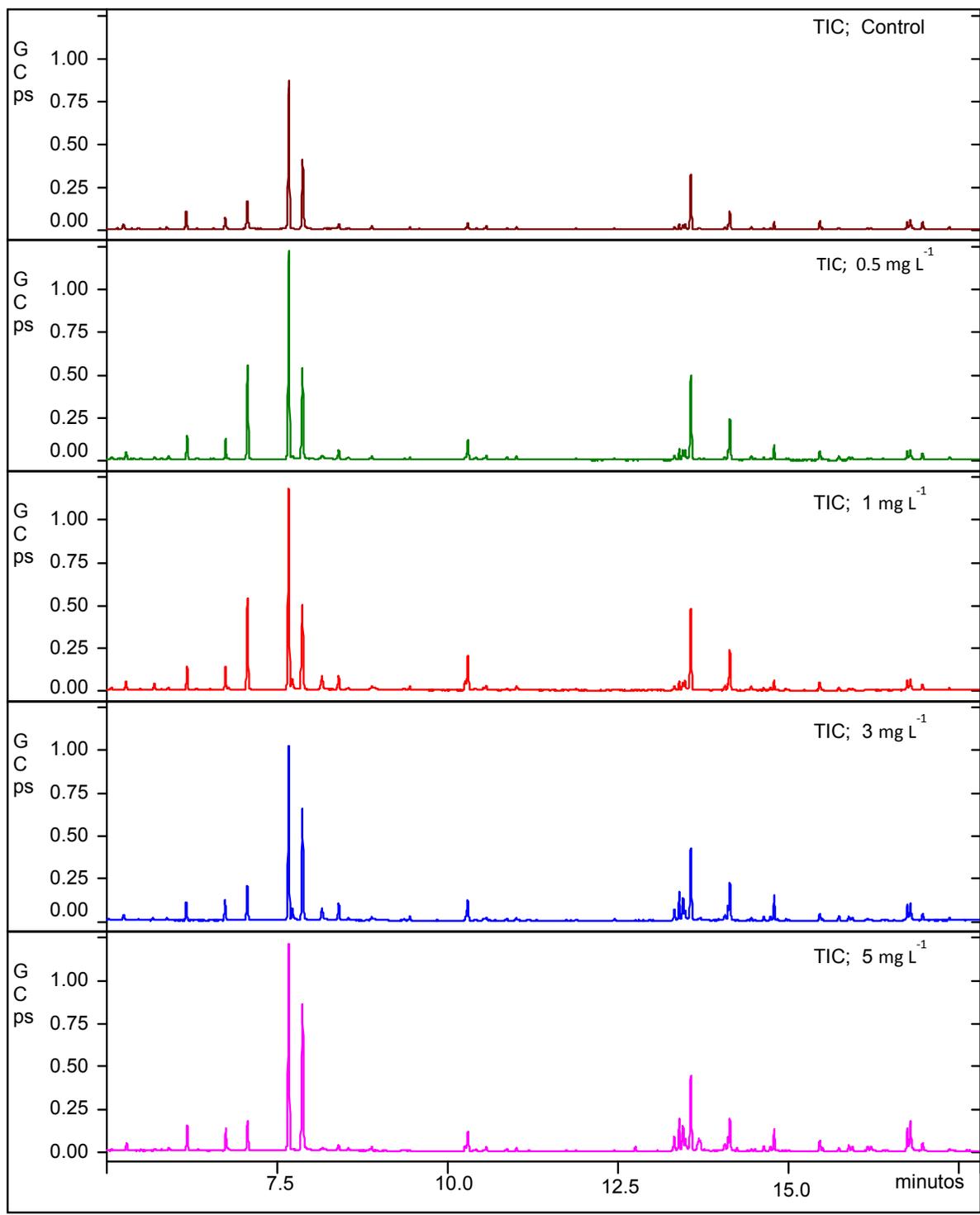


Figura 29. Cromatogramas típicos GC-MS de compuestos extraídos de plantas crecidas en presencia de diferentes concentraciones de Se (IV) en medio de cultivo, obtenidos después de la derivatización con BSTFA.

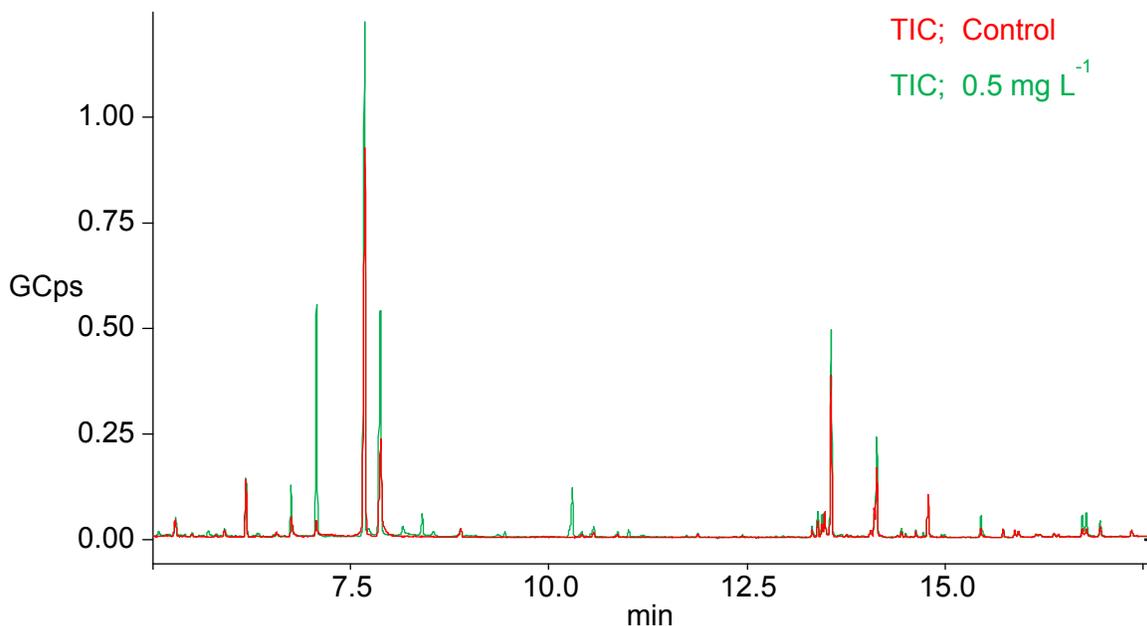


Figura 30. Cromatogramas TIC adquiridos en el sistema GC-MS para extractos de raíz expuestos a Se(IV) y para el control (derivatización con BSTFA)

Los resultados obtenidos de las muestras analizadas fueron utilizados para llevar a cabo un análisis quimiométrico, esto con el fin de identificar posibles cambios entre las diferentes condiciones de germinación. Para analizar los cromatogramas obtenidos se tomaron en cuenta los picos que presentaban la relación señal/ruido (S/N) arriba de 20. Se obtuvieron las áreas de los picos cromatográficos. Los resultados obtenidos presentaron diferencias entre áreas de las señales de varios picos cromatográficos, dependiendo de la concentración de Se (IV) en el medio. En busca de identificar posibles relaciones, los datos obtenidos de los diferentes tratamientos, se llevó a cabo un análisis estadístico multivariante, utilizando el método de análisis de componentes principales (PCA). Para cada una de las condiciones de crecimientos (0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg L⁻¹) se tomaron como variable los tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos, diferentes al blanco de reacción y con una relación señal ruido (S/N) mayor a 20. El modelo obtenido lo definen los primeros dos componentes principales (PCs) los cuales representan el 73 % de la varianza total de los datos monitoreados. La figura 31 corresponde a la gráfica de los “scores” en donde se presenta el ordenamiento de las muestras en el espacio de las coordenadas de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), ahí se puede observar la distribución de las muestras de acuerdo con la concentración de Se(IV) en el medio de germinación; por ejemplo, en la sección inferior izquierda se ubica el tratamiento control, mientras que en la parte superior del mismo lado se ubica la asociación de los tratamientos con bajas concentraciones Se(IV) (0.5 y 1.0 mg L⁻¹), por último, a la derecha del PC1 se

observa los tratamientos con alta concentración de Se(IV) (3.0 y 5.0 mg L⁻¹ superior e inferior derecha respectivamente). La distribución en el espacio bidimensional de las condiciones de germinación en la gráfica de los “scores” sugiere que puede haber posibles diferencias en el perfil metabólico entre los diferentes tratamientos.

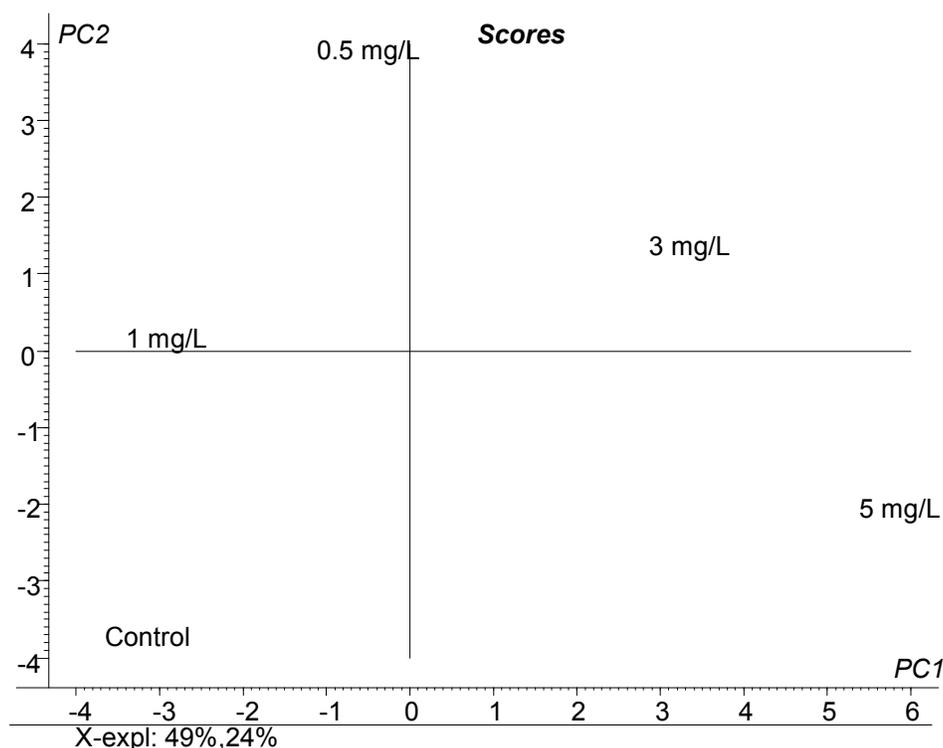


Figura 31. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de los germinados de alfalfa (score). Para el componente PCA 1 la variación explicada es 49% y para PCA 2 un 24 %.

Por otro lado, en la Figura 32 se presenta la distribución de las variables monitoreadas (*X-loadings*), en el espacio de los dos componentes principales (PC1 y PC2); en esta gráfica se observa la distribución de los tiempos de retención correspondientes a los picos cromatográficos seleccionados ($S/N > 20$ y no presentes en el blanco de reacción), en donde se puede notar que la mayor densidad de picos cromatográficos se distribuye en la zona correspondiente a los tratamientos con Se(IV) (descrita anteriormente para la gráfica de los scores), lo que podría sugerir diferencias en el perfil metabólico cuando las semillas de alfalfa son germinadas en medio enriquecido con Se(IV) comparado con el control.

Una vez eliminado todas aquellas señales con baja intensidad y señales pertenecientes al blanco de reacción, se obtuvo una tabla de precursores se aplicaron los mismos parámetros ($p < 0.05$, $\text{fold change} \geq 1.5$ y $\text{intensidad} > 5 \times 10^4$) aplicados para la elaboración de la gráfica de nubes. En la Tabla 32 se presenta la lista de características moleculares con sus respectivos valores de tiempo de retención, m/z y significancia (p) encontrados.

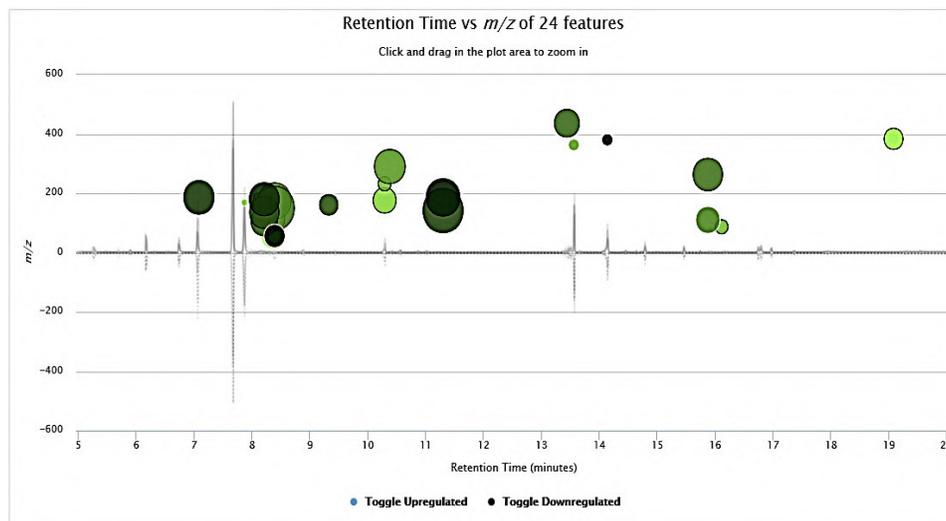


Figura 33. Gráfica de nubes generada en XCMS a partir de los datos GC-MS para muestra control y expuesta a 5 mg Se L-1, con los siguientes parámetros: $p < 0.05$, $\text{fold change} \geq 1.5$ y $\text{intensidad} > 5 \times 10^4$

Tabla 32. Lista de precursores los cuales presentaron una regulación positiva al ser expuestas a Se (IV).

<i>m/z</i>	TR	fold	p value
186.0	7.09	6	0.010
184.0	8.12	2	0.037
150.1	8.39	11	0.028
161.1	9.33	3	0.020
232.2	10.29	2	0.038
436.1	13.45	5	0.026
363.2	13.56	2	0.040
322.1	14.13	3	0.036
110.1	15.88	5	0.031

Una vez realizado el análisis estadístico se intentó identificar los compuestos de la lista de precursores obtenidos por XCMS con base en los índices de retención y espectros de masas. La identificación basada en el índice de retención (IR) de un compuesto es más confiable que la identificación basada en el tiempo de retención. Esto se debe a que el tiempo de retención depende de las condiciones

de análisis mientras que el índice de retención es independiente de las condiciones y seguirá siendo el mismo en una fase estacionaria determinada. Para la determinación del índice de retención, se necesita llevar a cabo la separación de una mezcla de n-alcenos. Estos alcanos se pueden separar mediante una columna capilar adecuada, además de que por convención tendrán IR bien definidos. Existen bibliotecas que ofrecen la posibilidad de realizar una búsqueda basada en el IR lo que aumenta considerablemente la confiabilidad de identificación. Para la obtención de los índices de retención de la serie de alcanos, se inyectó al sistema GC-MS 1 uL de la serie de alcanos (estándar de alcanos de C10 al C40 a una concentración de 5.0 mg L^{-1}), las condiciones instrumentales fueron las mismas descritas en la Tabla (31). El cromatograma obtenido se presenta en la Figura (34).

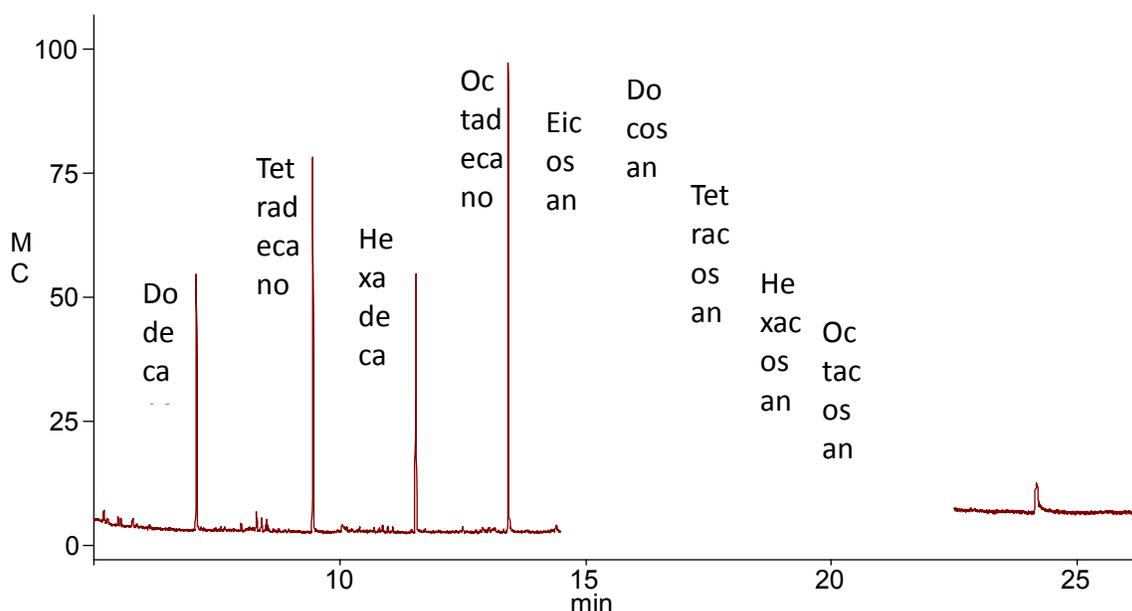


Figura 34. Se muestra el cromatograma de los picos detectados de la serie de alcanos.

El análisis de datos se realizó utilizando el software AMDIS para primeramente realizar la desconvolución de los cromatogramas obtenidos y posteriormente trabajar en el modo de uso de datos del índice de retención. La identificación de los compuestos se realizó a través del software NIST MS Search 2.0 mediante la comparación de los espectros obtenidos de las muestras con los espectros en las bibliotecas NIST y Wiley. En la Tabla 33 se presentan los IR experimentales obtenidos de la corrida cromatográfica de la serie de alcanos analizada junto con los IR teóricos, donde se observa una buena concordancia entre estos valores.

Tabla 33. Serie de n-alcenos detectados en CG-MS

n-Alcano	TR	IR exp	IR teórico
Dodecano (C12)	7.08	1199	1200
Tetradecano (C14)	9.45	1400	1400
Hexadecano (C16)	11.54	1600	1600
Octadecano (C18)	13.42	1800	1800
Eicosano (C20)	15.12	2000	2000
Docosano (C22)	16.68	2200	2200
Tetracosano (C24)	18.11	2399	2400
Hexacosano (C26)	19.45	2600	2600
Octacosano (C28)	20.67	2800	2800

Posterior a la obtención de los IR de la serie de alcanos, se llevó a cabo la identificación de las características moleculares que presentaron diferencias significativas presentadas en la Tabla 32; para la identificación de los compuestos individuales fue con base al IR, espectros de masas y su probabilidad respecto a las bibliotecas NIST y Wiley.

En la figura 36 se presenta un cromatograma correspondiente al TIC, donde se logró determinar la presencia de D-pinitol (tiempo de retención 13.56 min) en los germinados de todos los tratamientos. Este compuesto estuvo presente en la lista de precursores después del procesamiento y análisis estadísticos por XCMS, los cuales presentaron una regulación positiva bajo exposición de alfalfa a Se (IV). En la Figura 35 se muestra el espectro de masas experimental del Pinitol y su comparación con el respectivo espectro de la biblioteca a través del software NIST MS Search 2.0. La buena concordancia entre estos dos espectros queda confirmada por un valor MF muy cercano a 97.8 % de probabilidad que sea el compuesto mencionado y un valor de % RSD de 0.04 respecto a sus índices de retención experimental y teórico (1816.4 y 1815.3 respectivamente).

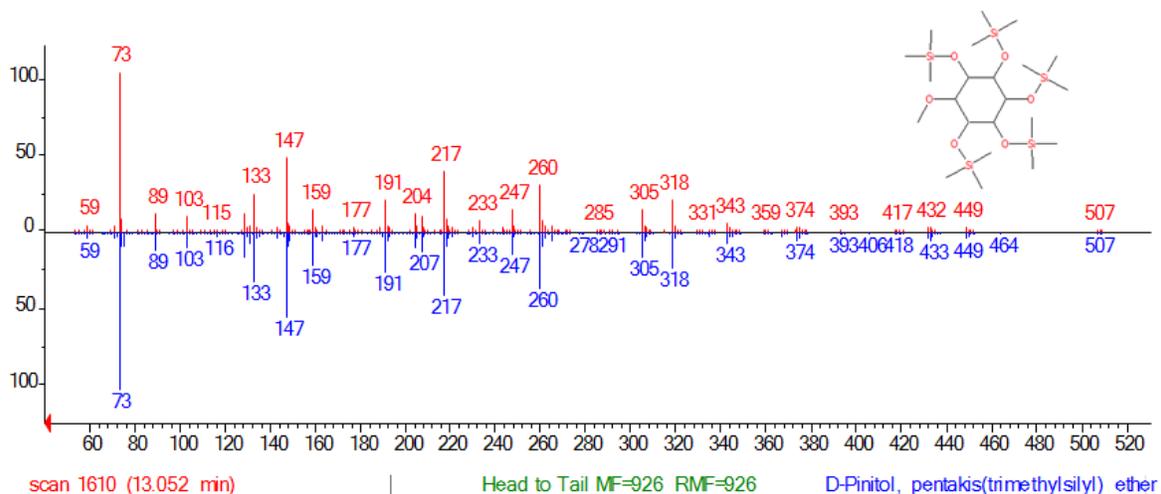


Figura 35. Comparación de los espectros experimentales (rojo) y del NIST (azul) perteneciente al estándar del D-Pinitol.

Lo interesante de la identificación de D-Pinitol es el posible efecto que tiene la presencia de Se(IV) en el medio de germinación sobre la síntesis de este compuesto; ya que en la Figura 36 se puede observar un aparente aumento en su contenido cuando la alfalfa germinó en medios con baja concentración de selenio (0.5 y 1.0 mg L^{-1}) comparado con el control y altas concentraciones (3.0 y 5.0 mg L^{-1}); lo que concuerda con la distribución en la gráfica de los *X-loadings* del modelo PCA de la Figura 32 (anteriormente descrita), donde se puede observar que la señal cromatográfica correspondiente al pinitol (13.56 min) se encuentra asociada a las condiciones de exposición 0.5 y 1.0 mg L^{-1} (posicionados en el cuadrante superior izquierdo). Este efecto es relevante ya que, podría contribuir en el conocimiento para el diseño de estrategias de biofortificación de plantas comestibles con Se y la subsecuente producción de alimentos funcionales. Recientemente, el estudio de D-pinitol ha ganado mucho interés tanto por sus efectos farmacológicos (antidiabético), como por su posible aplicación en tratamientos como complemento alimenticio debido a su función similar a la insulina y su potencial en el tratamiento de la diabetes, en el tratamiento de enfermedades hepáticas, depresión, trastornos de personalidad, SIDA y cáncer [92, 93].

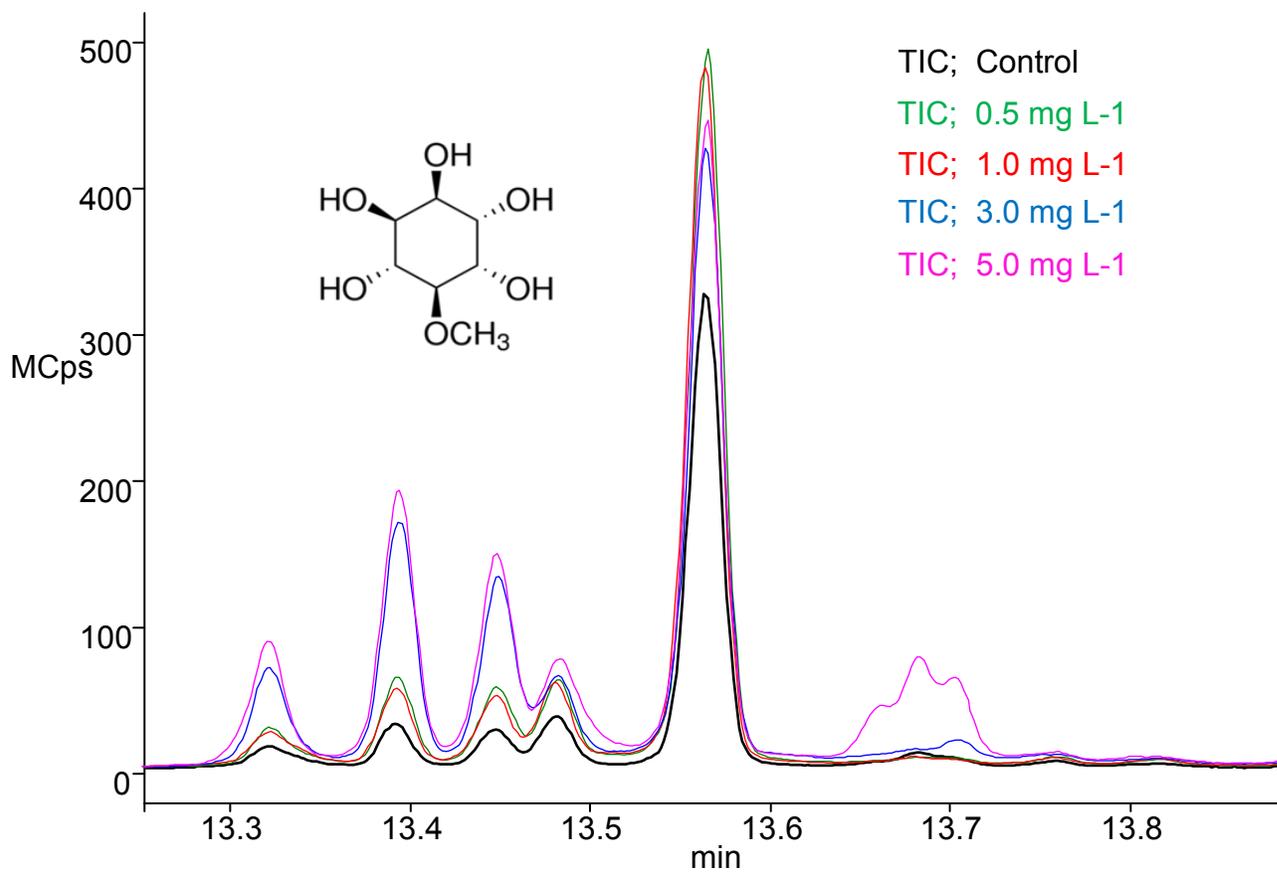


Figura 36. Cromatograma TIC del pico perteneciente al D-pinitol.

El D-pinitol es un O-metilciclitol que pertenece a la familia de los ciclitoles, cuya presencia en alfalfa ya ha sido reportada [78]. La síntesis química de D-pinitol a partir de benceno y otros ciclohexitoles en el laboratorio se ha reportado, pero no se utiliza en la producción industrial debido al alto costo de producción. En las plantas esta biosíntesis se lleva a cabo a través de una conversión de dos pasos del myo-inositol [92]; el grupo metilo de S-adenosil-l-metionina se transfiere primero a myo-inositol para sintetizar ononitol por inositol metil transferasa (IMT). El ononitol se convierte luego en pinitol por una epimerasa que ya se ha aislado y caracterizado (Figura 37). El ononitol (1-D-4-O-metil-myo-inositol) es un intermedio muy estable y transitorio de muy poca cantidad en la producción de D-pinitol [92, 94-96].

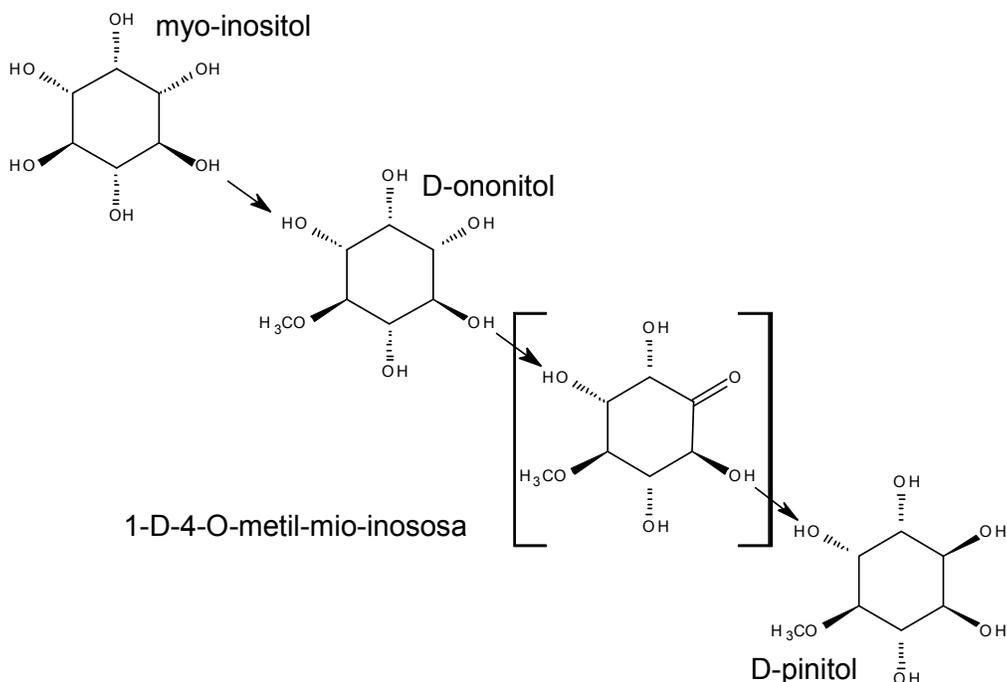


Figura 37. Conversión bioquímica de mioinositol en pinitol [94].

Aunque el efecto del Se en la síntesis de ciclitoles en plantas no ha sido estudiado, y considerando que en la ruta de biosíntesis de pinitol (arriba descrita) se lleva a cabo un paso de metilación en el que se involucran enzimas metiltransferasas; surge como supuesto de investigación el estudio del efecto de selenio en los procesos de metilación en los germinados de alfalfa; para ello se tienen como antecedentes estudios realizados en el grupo de investigación en donde se reportó cambios en la metilación global de ADN y ARN en *Lepidium sativum* cultivado hidropónicamente en presencia de diferentes concentraciones de Cd (II) o Se (IV), mostraron un aumento de la metilación del ADN en las plantas tratadas hasta niveles de concentración de 2 mg L^{-1} Cd y 1 mg L^{-1} Se en el medio de crecimiento. Para una mayor concentración de estrés, la metilación global del ADN tendió a disminuir [97]; lo que podría significar un enfoque de estudio para elucidar el efecto de Se en la síntesis de D-pinitol; por otro lado para *Mesembryanthemum crystallinum* se ha sugerido que este compuesto desempeña un rol como regulador osmótico cuando la planta es expuesta a condiciones de estrés abiótico como sequía y altas concentraciones sales en el suelo [94], lo que podría influir a que la alfalfa soporte la presencia de Se en la célula.

Para continuar con el estudio se ha sugerido como perspectiva el desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de ciclitoles.

5 Conclusiones

- ❖ Se demostró la capacidad de germinados de alfalfa para crecer en presencia de Se(IV) hasta su concentración en medio de 5 mg L^{-1} , observando la captación del elemento en biomasa creciente con el aumento de Se(IV) en medio.
- ❖ Haciendo uso de herramientas estadística **PCA** se obtuvo un modelo que permitió hallar relaciones entre la captación de Se y el contenido de elementos esenciales, el tema de interés en estudio de posibles procesos fisiológicos afectados por la exposición a Se(IV).
- ❖ En el análisis ionómico, se encontró el efecto benéfico de Se(IV) en la captación de otros micronutrientes minerales (Mn, Zn, Na y K) en germinados, aunque se observó también disminución en la captación de Cu, Mo, Ca y Mg. Puesto que la concentración de Se(IV) en medio era un factor importante en el tráfico de elementos, es necesario seleccionar adecuadamente esta concentración para asegurar el mejor posible perfil de metales/metaloideos esenciales en germinados biofortificados.
- ❖ En el experimento de fraccionamiento celular, se observó la presencia de compuestos de Se de baja masa molecular (S2). El análisis HPLC-ICP-MS de esta fracción indicó la formación de SeCys, MeSeCys y SeMet en germinados. En este análisis se detectaron especies desconocidas de Se.
- ❖ Para cuantificación de Se-aminoácidos en fracción de baja masa molecular de germinados (S2), se estableció un procedimiento basado en la derivatización con propilcloroformiato y análisis por HPLC-ESI-ITMS con cuantificación MRM, aunque es necesaria su adecuación preconcentración tomando en cuenta bajas concentraciones de especies que se presentan en los extractos y las posibles interferencias de la matriz. En los resultados obtenidos de los germinados, solo se encontró la cistina de las 6 especies buscadas; la cual estuvo presente en la muestra control y en el tratamiento de 5 mg Se L^{-1} pero sin ningún cambio notable entre las dos.
- ❖ Para avanzar en la caracterización de especies de Se desconocidas, se utilizó el sistema capHPLC-ESI-QTOF-MS. En el análisis de las soluciones estándar se observó formación de diferentes compuestos provenientes de la reacción de derivatización con PCF.
- ❖ De la misma manera como en el análisis por HPLC-ESI-ITMS los resultados arrojados en el análisis de los extractos acuosos realizados por capHPLC-ESI-QTOF-MS se observó la presencia de cistina el cual es confirmado al

comparar el cromatograma del estándar de cistina y con su espectro de masas.

- ❖ Los resultados obtenidos de las muestras analizadas por GC-MS fueron utilizados para llevar a cabo un análisis quimiométrico, esto con el fin de identificar posibles cambios entre las diferentes condiciones de germinación. En busca de identificar posibles relaciones los datos obtenidos de los diferentes tratamientos, se llevó a cabo un análisis estadístico multivariante, utilizando el método de análisis de componentes principales (PCA). Se tomaron como variable los tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos. Posterior al análisis estadístico, se intentó identificar las señales con diferencias significativas observadas en el PCA anteriormente descrito. Para esto, se realizó el procesamiento y análisis estadísticos de los datos crudos obtenidos por GC-MS los cuales fueron cargados en la plataforma XCMS. Se obtuvo una tabla de precursores se aplicaron los mismos parámetros ($p < 0.05$, $\text{fold change} \geq 1.5$ y $\text{intensidad} > 5 \times 10^4$) aplicados para la elaboración de la gráfica de nubes. Una vez realizado el análisis estadístico se intentó identificar los compuestos de la lista de precursores obtenidos por XCMS con base en los índices de retención y espectros de masas.
- ❖ Los resultados obtenidos por CG-MS muestran la presencia de D-pinitol en todos los extractos, sin embargo, cuando las plantas son germinadas en exposición a Se(IV) existe un aumento significativo respecto a los germinados control especialmente a bajas concentraciones (0.5 y 1.0 mg L⁻¹). Este compuesto es un O-metilciclitol que a su vez pertenece a la familia de los ciclitoles, cuya presencia en alfalfa ya ha sido reportada; sin embargo, la importancia del efecto de selenio sobre este compuesto radica en las propiedades farmacológicas que se le han atribuido (antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y antidiabéticas), lo que podría sugerir que con la exposición a selenio los germinados de alfalfa podrían mejorar su calidad nutricional [3].

6 Bibliografía

1. Welch, R.M., *Biotechnology, biofortification, and global health*. Food and Nutrition Bulletin, 2005. **26**(4_suppl3): p. S304-S306.
2. Welch, R.M., *Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally*. The Journal of nutrition, 2002. **132**(3): p. 495S-499S.
3. Bouis, H.E. and R.M. Welch, *Biofortification—a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south*. Crop Science, 2010. **50**(Supplement_1): p. S-20-S-32.
4. Gardner, C.D., et al., *Micronutrient quality of weight-loss diets that focus on macronutrients: results from the A TO Z study*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2010. **92**(2): p. 304-312.
5. Michaud, D.S., et al., *Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men*. American journal of epidemiology, 2000. **152**(12): p. 1145-1153.
6. Alvidrez-Morales, A., B.E. González-Martínez, and Z. Jiménez-Salas, *Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales*. RESPyN, 2002. **3**(3).
7. Contor, L., *Functional Food Science in Europe*. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD, 2001. **11**(4 Suppl): p. 20-23.
8. Gergely, V., et al., *Selenium species in aqueous extracts of alfalfa sprouts by two-dimensional liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry detection*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006. **54**(13): p. 4524-4530.
9. Versini, A., et al., *Influence of Se concentrations and species in hydroponic cultures on Se uptake, translocation and assimilation in non-accumulator ryegrass*. Plant Physiology and Biochemistry, 2016. **108**: p. 372-380.
10. Bouis, H.E., et al., *Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition*. Food Nutr Bull, 2011. **32**(1 Suppl): p. S31-40.
11. Márquez-Quiroz, C., et al., *La biofortificación de cultivos: una alternativa que contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional*. 2015. 14-23.
12. White, P.J. and M.R. Broadley, *Biofortifying crops with essential mineral elements*. Trends in Plant Science, 2005. **10**(12): p. 586-593.
13. Beltrano, J. and D.O. Gimenez, *Cultivo en hidroponía*. 2015: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
14. Chasquibol, N., et al., *Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia*. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, 2003. **6**(2): p. 9-20.
15. Teoh, E.S., *Secondary Metabolites of Plants, in Medicinal Orchids of Asia*. 2016, Springer. p. 59-73.
16. Yáñez Barrientes, E., et al., *Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in Lepidium sativum*. Journal of the Mexican Chemical Society, 2012. **56**(1): p. 03-09.
17. Ahmad, P., et al., *Exogenous application of selenium mitigates cadmium toxicity in Brassica juncea L.(Czern & Cross) by up-regulating antioxidative system and secondary metabolites*. Journal of plant growth regulation, 2016. **35**(4): p. 936-950.
18. Nwugo, C.C. and A.J. Huerta, *Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium*. Plant and soil, 2008. **311**(1-2): p. 73-86.

19. Kalinowska, M., B. Hawrylak-Nowak, and M. Szymańska, *The Influence of Two Lithium Forms on the Growth, l-Ascorbic Acid Content and Lithium Accumulation in Lettuce Plants*. Biological Trace Element Research, 2013. **152**(2): p. 251-257.
20. Hawrylak-Nowak, B., M. Kalinowska, and M. Szymańska, *A Study on Selected Physiological Parameters of Plants Grown Under Lithium Supplementation*. Biological Trace Element Research, 2012. **149**(3): p. 425-430.
21. Mahmoudi, H., et al., *The Impact of Genotype and Salinity on Physiological Function, Secondary Metabolite Accumulation, and Antioxidative Responses in Lettuce*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 5122-5130.
22. Winkel, L.H., et al., *Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review*. Nutrients, 2015. **7**(6): p. 4199-4239.
23. Wu, Z., et al., *Biofortification and phytoremediation of selenium in China*. Frontiers in plant science, 2015. **6**: p. 136.
24. Broadley, M.R., et al., *Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation*. Plant and Soil, 2010. **332**(1-2): p. 5-18.
25. Montes-Bayón, M., et al., *Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS*. Talanta, 2006. **68**(4): p. 1287-1293.
26. BIRD, S. and J. TYSON, *Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1997. **12**(7): p. 785-788.
27. Thosaikham, W., et al., *Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC-ICP-MS*. Food chemistry, 2014. **145**: p. 736-742.
28. Wróbel, K., et al., *HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves—a potential dietary source of Se-methylselenocysteine*. Food Chemistry, 2004. **86**(4): p. 617-623.
29. Barrientos, E.Y., et al., *Determination of SeMet and Se (IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES)*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2016. **31**(1): p. 203-211.
30. Schrauzer, G.N., *Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety*. Journal of the American College of Nutrition, 2001. **20**(1): p. 1-4.
31. Hsia, H.S., P. Yang, and M. Arnold, *Dietary supplementation with, and methods for administration of yeast-derived selenium product*. 2001, Google Patents.
32. Montes-Bayón, M., et al., *Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS*. Talanta, 2006. **68**(4): p. 1287-1293.
33. Pyrzynska, K., *Selenium speciation in enriched vegetables*. Food chemistry, 2009. **114**(4): p. 1183-1191.
34. Ruszczyńska, A., et al., *Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2017. **130**: p. 7-16.
35. Kápolna, E. and P. Fodor, *Speciation analysis of selenium enriched green onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS*. Microchemical Journal, 2006. **84**(1): p. 56-62.
36. Pedrero, Z., Y. Madrid, and C. Cámara, *Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): a potential dietary source of selenium*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006. **54**(6): p. 2412-2417.

37. Pedrero, Z., et al., *Selenium transformation studies during Broccoli (Brassica oleracea) growing process by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (LC–ICP–MS)*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **596**(2): p. 251-256.
38. Kahakachchi, C., et al., *Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating Brassica juncea (Indian mustard) and in selenized yeast*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1054**(1): p. 303-312.
39. Guevara Moreno, O.D., F.J. Acevedo Aguilar, and E. Yanez Barrientos, *Selenium Uptake and Biotransformation and Effect of Selenium Exposure on the Essential and Trace Elements Status: Comparative Evaluation of Four Edible Plants*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2018. **62**(2): p. 247-258.
40. Salinas, G., *Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana*. *Mensaje Bioquímico*, 2010. **34**: p. 121-133.
41. Birringer, M., S. Pilawa, and L. Flohé, *Trends in selenium biochemistry*. *Natural product reports*, 2002. **19**(6): p. 693-718.
42. Lintschinger, J., et al., *Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000. **48**(11): p. 5362-5368.
43. Funes-Collado, V., et al., *Study of selenocompounds from selenium-enriched culture of edible sprouts*. *Food chemistry*, 2013. **141**(4): p. 3738-3743.
44. Suárez, D. and L.M. Melgarejo, *Biología y germinación de semillas*. *Experimentos en fisiología vegetal*, 2010: p. 13-249.
45. Bewley, J.D. and M. Black, *Seeds, in Seeds*. 1994, Springer. p. 1-33.
46. Jones, O.A.H., et al., *The use of metabolomics in the study of metals in biological systems*. *Metallomics*, 2015. **7**: p. 29-38.
47. Arruda, M.A.Z. and R.A. Azevedo, *Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants*. *Ann Appl Biol*, 2009. **155**(3): p. 301-307.
48. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. *J Anal At Spectrom*, 2004. **19**: p. 5.14.
49. Ma, N.L., Z. Rahmat, and S.S. Lam, *A review of the "Omics" approach to biomarkers of oxidative stress in Oryza sativa*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(4): p. 7515-41.
50. Suzuki, K.T., *Metabolomics of arsenic based on speciation studies*. *Anal Chim Acta*, 2005. **540**: p. 71–76.
51. Salt, D.E., *Plant Metallomics*. *Metallomics*, 2013. **5**(9): p. 1088-1089.
52. Mounicou, S., J. Szpunar, and R. Lobinski, *Metallomics: the concept and methodology*. *Chemical Society Reviews*, 2009. **38**(4): p. 1119-1138.
53. Arruda, M. and R. Azevedo, *Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants*. *Annals of Applied Biology*, 2009. **155**(3): p. 301-307.
54. López-Barea, J. and J.L. Gómez-Ariza, *Environmental proteomics and metallomics*. *Proteomics*, 2006. **6**(S1).
55. Hartinger, C.G., et al., (2007). *Mass spectrometric analysis of ubiquitin–platinum interactions of leading anticancer drugs: MALDI versus ESI*. *J Anal At Spectrom*, 2007. **22**: p. 960-967.
56. Yaroshenko, D.V., et al., *Determination of cisplatin in blood plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection*. *J Anal Chem*, 2013. **68**: p. 156-160.
57. Petkovic, M., et al., *Application of flavonoids – quercetin and rutin – as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt(II) and Pd(II) complexes*. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2009. **23**: p. 1467-1475.

58. Minakata, K., et al., *MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of gold and platinum in tissues using their diethyldithiocarbamate chelate complexes*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**: p. 1331-1338.
59. Jones-Lepp, T.L. and G.M. Momplaisir, *New applications of LC-MS and LC-MS2 toward understanding the environmental fate of organometallics*. Trend Anal Chem, 2005. **24**: p. 590-595.
60. Feldmann, J., *Elemental and molecular mass spectrometry for speciation analysis*. Anal Bioanal Chem, 2008. **390**: p. 1683-1684.
61. Wall, S., *Lower operating costs, safer operation, Agilent 4100 MP-AES*. Agilent technologies. Application note, 2012.
62. Litter, M.I.A., M.A.; Farías, S.S., *Iberoarsen. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), 2009.
63. Skoog, D.A.H., James F.; Nieman, Timothy A., *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición ed. 1992.
64. Technologies, A., *Agilent 4210 MP-AES Specifications*. 2016: p. 1-8.
65. Thomas, R., *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 2013: CRC press.
66. May, T.W. and R.H. Wiedmeyer, *A table of polyatomic interferences in ICP-MS*. ATOMIC SPECTROSCOPY-NORWALK CONNECTICUT-, 1998. **19**: p. 150-155.
67. Tanner, S.D., V.I. Baranov, and D.R. Bandura, *Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2002. **57**(9): p. 1361-1452.
68. Ojeda, A.G., et al., *Effect of Cd (II) and Se (IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in Lepidium sativum*. Metallomics, 2013. **5**(9): p. 1254-1261.
69. Shah, M., et al., *Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (Allium fistulosum) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(3): p. 381-386.
70. Maneetong, S., et al., *Hydroponic cultivation of selenium-enriched kale (Brassica oleracea var. alboglabra L.) seedling and speciation of selenium with HPLC-ICP-MS*. Microchemical Journal, 2013. **108**: p. 87-91.
71. 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.
72. Mattila, P., J. Astola, and J. Kumpulainen, *Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(12): p. 5834-5841.
73. Ruiz, J.J.R., *Biofortificación con Se en plantas de lechuga: estudio de la producción, calidad y estado nutricional*. 2008: Editorial de la Universidad de Granada.
74. Mahmoudi, H., et al., *The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(8): p. 5122-5130.
75. Kritikos, N., et al., *Liquid chromatography coupled to quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry based quantitative structure-retention relationships of amino acid analogues derivatized via n-propyl chloroformate mediated reaction*. Journal of Chromatography A, 2015. **1403**: p. 70-80.

76. Navarro, Y.M.C., et al., *Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (Zea mays L.)*. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 2017. **13**(1): p. 65-68.
77. Jing, C.-L., X.-F. Dong, and J.-M. Tong, *Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method*. Molecules, 2015. **20**(9): p. 15550-15571.
78. Al-Suod, H., et al., *A window on cyclitols: characterization and analytics of inositols*. Phytochemistry letters, 2017. **20**: p. 507-519.
79. Britannica, T.E.o.E. *alfalfa*. Encyclopædia Britannica; Available from: <http://www.britannica.com/secure/sci-hub.io/plant/alfalfa>.
80. Tie, M., et al., *Selenium speciation in soybean by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization–tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS)*. Microchemical Journal, 2015. **123**: p. 70-75.
81. Clark, L., et al., *Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial*. British journal of urology, 1998. **81**(5): p. 730-734.
82. Tapiero, H., D. Townsend, and K. Tew, *The antioxidant role of selenium and seleno-compounds*. Biomedicine & pharmacotherapy, 2003. **57**(3-4): p. 134-144.
83. Zeng, H., M. Wu, and J.H. Botnen, *Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes*. The Journal of nutrition, 2009. **139**(9): p. 1613-1618.
84. Tie, M., et al., *Identification and quantitation of seleno-amino acids in mung bean sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC–MS)*. European Food Research and Technology, 2018. **244**(3): p. 491-500.
85. Hušek, P., *Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **717**(1-2): p. 57-91.
86. Smart, K.F., et al., *Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry*. Nature protocols, 2010. **5**(10): p. 1709.
87. Jones-Lepp, T.L. and G.-M. Momplaisir, *New applications of LC–MS and LC–MS2 toward understanding the environmental fate of organometallics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(7): p. 590-595.
88. Grimm, F., L. Fets, and D. Anastasiou, *Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) to study metabolism in cultured cells, in Tumor Microenvironment*. 2016, Springer. p. 59-88.
89. Moldoveanu, S.C. and V. David, *Modern sample preparation for chromatography*. 2014: Elsevier.
90. Orata, F., *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis, in Advanced gas chromatography-Progress in agricultural, biomedical and industrial applications*. 2012, IntechOpen.
91. Little, J.L., *Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them*. Journal of chromatography A, 1999. **844**(1-2): p. 1-22.
92. Chen, J., et al., *Optimization of D-pinitol extraction from vegetable soybean leaves and its potential application in control of cucumber powdery mildew*. Crop Protection, 2014. **60**: p. 20-27.
93. Croze, M.L. and C.O. Soulage, *Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases*. Biochimie, 2013. **95**(10): p. 1811-1827.

94. Loewus, F.A. and P.P. Murthy, *myo-Inositol metabolism in plants*. Plant science, 2000. **150**(1): p. 1-19.
95. Streeter, J., D. Lohnes, and R. Fioritto, *Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance*. Plant, Cell & Environment, 2001. **24**(4): p. 429-438.
96. Chiera, J.M., J.G. Streeter, and J.J. Finer, *Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the inositol methyl transferase gene from Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Science, 2006. **171**(6): p. 647-654.
97. Bothwell, I.R. and M. Luo, *Large-scale, protection-free synthesis of Se-adenosyl-L-selenomethionine analogues and their application as cofactor surrogates of methyltransferases*. Organic letters, 2014. **16**(11): p. 3056-3059.
98. Barrientos, E.Y., et al., *Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in Lepidium sativum: effect of plant exposure to Cd (II) and Se (IV)*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013. **405**(7): p. 2397-2404.
99. Malashock, D.S., *The reaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase with a substrate analog, Se-adenosyl-L-selenomethionine*. 2007: University of California, Berkeley.
100. Ogra, Y., *Identification of Selenometabolites in Animals and Plants by Mass Spectrometry*. Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects, 2015: p. 158.
101. Ogra, Y., et al., *Speciation of selenomethionine metabolites in wheat germ extract*. Metallomics, 2009. **1**(1): p. 78-86.
102. Vatansever, R., I.I. Ozyigit, and E. Filiz, *Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review*. Applied biochemistry and biotechnology, 2017. **181**(1): p. 464-482.
103. El-Ramady, H., et al., *Selenium and its Role in Higher Plants*, in *Pollutants in Buildings, Water and Living Organisms*, E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, and D. Robert, Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 235-296.
104. Preedy, V.R., *Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. 2015: Royal Society of Chemistry.