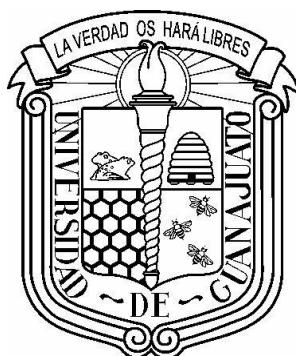


UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

POSGRADO EN QUÍMICA

**“EFECTO DE ESTRÉS ABIÓTICO IMPUESTO POR Cr(VI) EN EL PERFIL
METABOLÓMICO DE ALGUNOS ORGANISMOS VIVOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

PRESENTA

ALAN ALEXANDER GONZÁLEZ IBARRA

GUANAJUATO, GTO AGOSTO 2014

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título **“EFECTO DE ESTRÉS ABIÓTICO IMPUESTO POR Cr(VI) EN EL PERFIL METABOLÓMICO DE ALGUNOS ORGANISMOS VIVOS”**. Realizado por el QFB. Alan Alexander González Ibarra en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Maestro en Ciencias bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wróbel, la Dra. Katarzyna Wrobel y el Dr. J. Félix Gutiérrez Corona.

“La Verdad os hará Libres”

Dr. Kazimierz Wróbel

Dra. Katarzyna Wróbel

Dr. J. Félix Gutiérrez Corona

CONTENIDO

CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
Resumen	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Metabolómica.	3
1.2 Metabolismo en seres vivos.....	4
1.2.1 Aminoácidos.....	4
1.2.2 Carbohidratos.	6
1.2.3 Nucleótidos.....	8
1.2.4 Lípidos.....	9
1.3 Estrés en organismos vivos.....	13
1.4 Metabolitos secundarios.	14
1.5 Cromo como un factor del estrés abiótico	16
1.5.1 Cromo en el medio ambiente.	16

1.5.2. Cromo en organismos vivos.....	20
1.5.3. Uso de microorganismos en la neutralización/remoción de Cr(VI).....	24
1.6 Herramientas utilizadas en metabolómica	25
1.8 Justificación	29
2 Objetivos.....	30
3. Parte Experimental	31
3.1 Equipo de Laboratorio	31
3.2. Material de laboratorio.....	32
3.3. Estándares, reactivos y disolventes.....	32
3.4. Material biológico.....	33
3.5 Software	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. Estudio de la factibilidad de GC-FID junto con GC-MS para la identificación de cambios en el perfil metabólico de los organismos <i>Lepidium sativum</i> y <i>Helianthus annuus</i> expuestos a Cr(VI).	36
4.2. Estudio analítico de la reducción de Cr(VI) en cultivos de <i>Bacillus cereus</i> en presencia del ión Mn(II).	51
4.2.1. Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus cereus</i>	52
4.2.2. Ensayos de reducción de Cr(VI) en cultivos de <i>B. cereus</i>	54

4.2.3. Ensayos de reducción de cromo y evaluación de perfil de metabolitos en el medio de cultivo gastado.....	57
4.2.4 Especiación de Cr(III)/Cr(VI) por HPLC fase inversa con formación de pares iónicos acoplado a un espectrómetro de emisión atómica con plasma de nitrógeno.	66
5. CONCLUSIONES.....	74
6. BIBLIOGRAFÍA	75

INDICE DE FIGURAS

Figura	Legenda	Pág.
1	Estructura general de un α -aminoácido.	3
2	Esquema del contenido de información a diferentes niveles de datos estructurales de glicanos. MS, espectrometría de masas. CAMD, diseño molecular asistido por computadora. CE, electroforesis capilar. MM, mecanismo molecular.	7
3	Estructura de un nucleótido.	8
4	Estructura general de un ácido graso.	9
5	Estructura de un triacilglicerol.	10
6	Estructura de los lípidos asociados a membrana celular.	11
7	Típico flujo de trabajo en lípidomica.	12
8	Respuestas inducidas debido a la proliferación de ROS.	22
9	Estructura del ion sulfato y del ion cromato	23
10	El número de artículos publicados a partir del 2010 hasta el 2014, cuyo título contiene palabras “metabolomics”, “metabonomics” o “metabolites” junto con GC, LC o electrophoresis, o NMR.	29
11	Cromatogramas típicos de perfiles metabólicos utilizando CG-FID y derivatización con BSTFA. a) Cromatogramas de muestras de girasol expuesto a dos distintas concentraciones y un control (raíz). b) Cromatogramas de muestras de girasol expuesto a dos distintas concentraciones y un control (aérea). c) Cromatogramas de muestras de berros expuestos a dos distintas concentraciones y un control (aerea). d) Cromatogramas de muestras de berros expuestos a dos distintas concentraciones y un control (raíz).	39
12	Gráfica bidimensional de las muestras para dos componentes principales. Las variaciones explicadas por los dos componentes son de 56% y 18% para PCA1 y PCA2. Las muestras son de <i>Helianthus annuus</i> y fueron divididas en raíz y parte aérea.	40
13	Gráfica de las variables para los componentes principales 1 y 2.	41
14	Gráfica de la varianza residual de las variables de cada muestra.	42
15	La gráfica muestra la varianza total explicada por el modelo por los 3 componentes principales. Esta es calculada como $100 \times (\text{varianza inicial} - \text{varianza residual}) / \text{varianza inicial}$.	43
16	Señales obtenidas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Las muestras fueron expuestas a 0, 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI) y derivatizadas con BSTFA.	45
17	Cromatograma de muestras de raíces de <i>Helianthus annuus</i> expuestas a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI).	46
18	Muestras de la parte aérea de <i>Helianthus annuus</i> expuestas a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI) derivatizadas con	47

	BSTFA. A) Perfil completo. B) Acercamiento al área de los carbohidratos	
19	Cromatograma de CG-MS de muestras de medio Hoagland donde crecieron las plántulas de <i>Lepidium sativum</i> y fueron expuestas a 3 diferentes concentraciones de Cr(VI) y derivatizados con BSTFA.	49
20	Acercamiento de los cromatogramas del medio Hoagland en donde crecieron las plántulas de <i>Lepidium sativum</i> a diferentes concentraciones de Cr(VI). El compuesto presente es el ácido palmítico.	50
21	Crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> , en puro medio líquido, en medio líquido con 30 mg/L de Cr(VI), 50 mg/L de Cr(VI) y 11.8 mg/L de Mn(II).	53
22	Registro del pH del cultivo control durante 23 h del crecimiento.	53
23	Muestra el porcentaje de Cr(VI) residual en el medio a diferentes concentraciones de Mn(II).	56
24	Cromatograma de CG-MS en la región donde aparece el fosfato derivatizado.	59
25	Cromatogramas obtenidos en CG-FID. En línea continua observamos el estándar de ácido oxálico, en la línea punteada mostramos el ácido oxálico de una muestra que es medio con Cr(VI) en 30 mg/L. Las muestras fueron derivatizadas con BSTFA.	60
26	La figura muestra la sección donde aparece el ácido oxálico de 3 cromatogramas donde las muestras son: () medio gastado + 30 mg/L de Cr(VI), () medio gastado + 30 mg/L de Cr(VI) y 2.9 mg/L de Mn(II), () medio gastado + 30 mg/L de Cr(VI) y 11.8 mg/L de Mn(II).	61
27	Grafica bidimensional de las muestras para dos componentes principales. Las variaciones explicadas por los dos componentes son de 89% y 8% para PCA1 y PCA2.	63
28	Grafica de las variables para los componentes principales 1 y 2.	64
29	Grafica de la varianza residual de las variables de cada muestra (arriba). La grafica muestra la varianza total explicada por el modelo por los 3 componentes principales. Esta es calculada como $100 * (\text{varianza inicial} - \text{varianza residual}) / \text{varianza inicial}$ (abajo).	65
30	Cromatogramas representativos de la curva de calibración, 1.25 mg/L, 0.5 mg/L y 0.25 mg/L de Cr(III) y Cr(VI).	69
31	Se muestra la comparación de cromatogramas que relacionan la cantidad de Cr(VI) remanente con la concentración de Mn(II) en el medio de cultivo.	70
32	Muestra tres muestras a las cuales a dos de ellas se le agrego Cr(III) en dos distintas formas. En la primera se le agrego solución de Cr(III) y a la segunda se le agrego Cr(III)-EDTA.	72
33	En esta figura observamos la disminución de Cr(VI) conforme pasa el tiempo y la razón por la que no aparece Cr(III)-EDTA ya se ha	73

explicado antes.

INDICE DE TABLAS

Tabla	Leyenda	Pág.
1	Propiedades y convenciones asociadas a aminoácidos proteinogénicos.	4
2	Composición del medio de cultivo.	33
3	Indica las concentraciones de Mn(II) y de Cr(VI) en las muestras así como los volúmenes que se utilizaron de las soluciones y del medio.	34
4	La tabla muestra las condiciones del CG-FID a las que se inyectaron las muestras de <i>Lepidium sativum</i> y <i>Helianthus annuus</i> .	38
5	La tabla muestra las condiciones del CG-MS a las que se inyectaron las muestras de <i>Lepidium sativum</i> y <i>Helianthus annuus</i> .	44
6	Tabla con las concentraciones de Mn(II) y Cr(VI) utilizados para la evaluación de crecimiento.	52
7	Tabla con las concentraciones de Cr(VI) obtenidas por el método de DFC a través de 3:30, 6:30 y 24 horas. La columna inicio marca las concentraciones iniciales de Cr(VI) en el medio.	55
8	Muestra la concentración de Cr(VI) después de 3 horas a distintas concentraciones de Mn(II).	58
9	Condiciones del cromatografo de gases a las que se inyectaron las muestras.	59
10	Se muestra la disminución de ácido oxálico conforme aumenta la concentración de Mn(II).	61
11	Concentraciones de Mn(II) y Cr(VI) a las que fueron expuestas las fracciones de medio gastado.	62
12	Muestra las condiciones de los equipos.	68
13	Parámetros de las curvas de calibración.	69
14	Resultados de determinación de Cr(VI) por el método de 1,5-difenilcarbazida (DFC), obtenidos en medios de cultivo a diferente tiempo de contacto con Cr(VI) y/o con Mn(II) y a las 24 horas por HPLC – MP-AES (AES). Se presentan promedios y los respectivos valores DE, mg/L con base en tres réplicas independientes.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AES-MP	Espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas
Ala	Alanina
AMDIS	Sistema de identificación y desconvolución de espectros de masas automatizado.
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Foto ionización a presión atmosférica
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BSTFA	N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida.
CAMD	Diseño molecular asistido por computadora
CE	Electroforesis capilar
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DESI	Desorción de ionización por electro rociado
DPC	1,5 difenilcarbazida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Electroionización
ESI	Ionización por electro rociado
ESI	Ionización por electro rociado
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización por flama

GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ICP-MS	Plasma inductivamente acoplado acoplado a espectrometria de masas
Ile	Isoleucina
ITC's	Isotiocianatos orgánicos
Leu	Leucina
Lis	Lisina
m/z	Relación masa carga
MALDI	Desorción/ionización laser asistida por matriz
Met	Metionina
MS	Espectrometría de masas
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PCA	Análisis de componentes principales
pH	Potencial de Hidrogeno
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
ROS	Especies reactivas de oxigeno
S/N	Relación señal ruido
Ser	Serina
SIM	Monitoreo selectivo de iones
Thr	Treonina
TIC	Cromatograma de iones totales
TLC	Cromatografía de capa fina.
TOF	Tiempo de vuelo

Trp	Triftofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

RESUMEN

La captación del Cr(VI), las rutas de su reducción y sus efectos sobre los organismos vivos han sido extensamente estudiadas, sin embargo, aún se desconocen los aspectos que involucran a este elemento con ciertas respuestas biológicas de los organismos vivos y el rol que tienen algunos metabolitos en la reducción del Cr(VI) hasta Cr(III); el primero biodisponible y tóxico, el segundo mucho menos biodisponible y a bajas concentraciones considerado benéfico para un buen metabolismo de la glucosa en animales. Se ha reportado la resistencia de algunos organismos al cromo hexavalente así como la capacidad para reducirlo y/o acumularlo, ambos efectos son de interés en el área de la biorremediación de ambientes contaminados con este elemento.

Bajo este marco, el objetivo principal del proyecto de tesis ha sido realizar un estudio metabolómico en los organismos seleccionados con el fin de avanzar en el conocimiento de sus mecanismos defensivos en las condiciones de estrés abiótico impuesto por Cr(VI). El trabajo consistió en dos etapas: a) Estudio de la factibilidad de CG-FID junto con el análisis multivariante por el método de componentes principales (PCA) y CG-MS para la identificación de cambios en el perfil metabólico de los organismos *Lepidium sativum* y *Helianthus annuus* expuestos a Cr(VI); y b) Estudio analítico de la reducción de Cr(VI) en cultivos de *Bacillus cereus* en presencia del ión Mn(II).

En la primera parte de tesis se trabajó con las plantas *Lepidium sativum* y *Helianthus annuus*, las cuales fueron expuestas a tres distintas concentraciones de Cr(VI), 10 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L con sus respectivos controles. Se propuso una plataforma que consistió en el análisis por GC-FID con una derivatización pre-columna con BSTFA para la obtención de perfiles de metabolitos en cada una de las condiciones de exposición de las dos plantas; los datos obtenidos (intensidades de las señales que se presentan en los cromatogramas con diferentes tiempos de retención) fueron analizados por medio del PCA lo que permitió seleccionar los picos cromatográficos cuya intensidad fue afectada por la exposición de la planta a Cr(VI). Seguido de esto, se prosiguió con la identificación de los metabolitos encontrados en las plantas, para esta identificación se utilizaron estándares de varios compuestos y el análisis por CG-MS. Los resultados obtenidos

confirman que la plataforma que engloba las herramientas analíticas GC-FID, GC-MS y PCA es adecuada para estudiar la respuesta de las plantas al estrés abiótico impuesto por el Cr(VI). Se propone seguir con este tema en un trabajo futuro para lograr los resultados analíticos validados y las conclusiones contundentes.

En la segunda parte de este trabajo, utilizando las herramientas descritas en la primera parte, se realizó un estudio analítico sobre la reducción del Cr(VI) en cultivos de *Bacillus cereus* en presencia del ion Mn(II), dicha cepa bacteriana fue previamente aislada de desechos de una tenería. Para demostrar la reducción del Cr(VI) en este sistema, se ha desarrollado un procedimiento de especiación de Cr(VI)/Cr(III) basado en la separación cromatográfica y la detección en-línea del Cr por espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (HPLC – MP-AES). En los ensayos de reducción, se utilizaron concentraciones de 30 mg/L y 50 mg/L del Cr(VI) y 2.9mg/L, 5.9 mg/L y 11.8 mg/L de Mn(II). Los experimentos se llevaron a cabo en el medio de cultivo conteniendo los metabolitos secretados por la bacteria en presencia de los microorganismos y también en los medios gastados de los cuales las bacterias fueron retiradas por filtración. Los resultados obtenidos confirmaron la capacidad *B. cereus* para reducir el Cr(VI) y mostraron que el Mn(II) juega el papel de un facilitador del proceso. Se ha demostrado también, que el ácido oxálico, presente en el medio de cultivo como metabolito de la bacteria, participa como reductor en el proceso de reducción y que este proceso ocurre a pH neutro. Finalmente, los resultados del análisis de especiación revelaron que el producto de reducción (Cr(III)) es inmediatamente estabilizado en el medio de tal manera que no forma complejo con EDTA. En presencia de Mn(II) (entre 5.9 y 11.8 mg/L), el cultivo con densidad óptica inicial 0.5 es capaz de reducir completamente 30 mg/L Cr(VI) en un periodo de tiempo de 24 h.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolómica.

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

Existen distintas definiciones para metabolómica y algunas veces puede ser confundida con metabonómica, por eso es que definiremos estos dos términos de manera que puedan ser bien diferenciados. Metabolómica puede ser definida como un estudio global e imparcial del conjunto de pequeñas moléculas (menores a 1 kDa) en un sistema biológico (biofluido, tejido, órgano u organismo) [2]; otra definición nos habla de metabolómica como el campo emergente de la medición de todas las moléculas pequeñas (menos de 1500 Da) en una muestra biológica en un simple experimento y determinaremos metaboloma como todas estas pequeñas moléculas[3].

En cuanto a metabonómica, este término ha sido definido como la medición cuantitativa de la respuesta metabólica dinámica multi-paramétrica de organismos vivos a una estimulación patofisiológica o modificaciones genéticas[4, 5].

En cuanto a la importancia de la metabolómica en otras ramas de la ciencia, por ejemplo las ciencias de la salud, juega un rol determinante para el avance de nuevas estrategias terapéuticas y preventivas. Un claro ejemplo de esto es la incursión de la metabolómica como herramienta para el descubrimiento de nuevos marcadores que puedan ayudar a prevenir o detectar de manera temprana patologías. Un caso muy interesante es el del cáncer ya que explorando el metaboloma de esta enfermedad se pueden llegar a conocer cambios relativos fenotípicos para funciones

biológicas y de esta manera se pueden encontrar biomarcadores que definen un tipo particular de cáncer[6].

Aunado a estas ventajas también añadimos el descubrimiento de nuevos fármacos u objetivos farmacológicos[2].

Desde un punto de vista práctico podemos ver a la metabolómica desde distintos enfoques dependiendo de nuestro objetivo final. El primero de ellos es el más general, donde se trata de hacer una extracción de metabolitos lo más amplia posible y analizar cambios en general de un organismo o sistema sometido a distintas condiciones; a esto le llamaremos “fingerprinting” o huella digital. El segundo de ellos es el “footprinting” o lo que denominaremos huella; esta consiste un estudio de los metabolitos que están en el medio y el intercambio de estos compuestos con la célula. El tercero de estos enfoques es el que llamaremos “Profiling” o simplemente perfil; este consiste en el mapeo de una clase particular de metabolitos, por ejemplo aminoácidos. En cuarto lugar tenemos “flux analysis” o análisis de flujo que corresponde a rastrear un compuesto que ha sido etiquetado (regularmente con un isótopo) a través de una ruta o serie de rutas metabólicas. Y en último lugar tenemos el “targeted analysis” o análisis enfocado a un objetivo, este tiene carácter cuantitativo y se emplea para comparar concentraciones de uno o varios compuestos en el mismo sistema biológico, pero que se encuentra en diferentes condiciones experimentales [6].

1.2 Metabolismo en seres vivos.

Una vez definido el término de metabolómica, nos enfocaremos brevemente en el origen de estas biomoléculas, algunas de sus propiedades químicas y una breve reseña de su participación en las rutas metabólicas más representativas así como su importancia biológica. Estas biomoléculas que son compuestos orgánicos con una variedad de grupos funcionales.

1.2.1 Aminoácidos.

Los α -aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas, estos están constituidos por un grupo amino y un grupo carboxílico enlazados al mismo átomo de carbono. Las diferencias entre los α -aminoácidos reside en la cadena unida al α -carbono la cual puede variar en estructura, tamaño y carga eléctrica.

El átomo al que están unidos el grupo amino y el grupo carboxilo es llamado α -carbono. El grupo α -amino actúa como una base débil y está siempre protonada a pH fisiológico; de la misma manera, el grupo α -carboxilo actúa como un ácido débil y a pH fisiológico siempre está desprotonado (Fig.1)

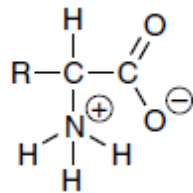


Fig.1 Estructura general de un α -aminoácido.

Los aminoácidos que comúnmente conforman proteínas son 20. Tabla 1

Tabla 1 Propiedades y convenciones asociadas a aminoácidos proteínogénicos.

Aminoácido	Abreviación, Símbolo	M_r	pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pI
Grupos R alifáticos, apolares					
Glicina	Gly, G	75	2.34	9.6	5.97
Alanina	Ala, A	89	2.34	9.69	6.01
Prolina	Pro, P	115	1.99	10.96	6.48
Valina	Val, V	117	2.32	9.62	5.97
Leucina	Leu, L	131	2.36	9.6	5.98
Isoleucina	Ile, I	131	2.36	9.68	6.02
Metionina	Met, M	149	2.28	9.21	5.74

Grupos R aromáticos					
Fenilalanina	Phe, F	165	1.83	9.13	5.48
Tirosina	Tyr, Y	181	2.2	9.11	5.66
Triftofano	Trp, W	204	2.38	9.39	5.89
Grupos R polares, sin carga					
Serina	Ser, S	105	2.21	9.15	5.68
Treonina	Thr, T	119	2.11	9.62	5.87
Cisteina	Cys, C	121	1.96	10.28	5.07
Asparagina	Asn, N	132	2.02	8.8	5.41
Glutamina	Gln, Q	146	2.17	9.13	5.65
Grupos R cargados positivamente					
Lisina	Lis, K	146	2.18	8.95	9.74
Histidina	His, H	155	1.82	9.17	7.59
Arginina	Arg, R	174	2.17	9.04	10.76
Grupos R cargados negativamente					
Aspartato	Asp, D	133	1.88	9.6	2.77
Glutamato	Glu, E	147	2.19	9.67	3.22

En adición a estos 20 aminoácidos, las proteínas contienen residuos creados por modificación de residuos comunes como lo son 4-hidroxiprolina, un derivado de la prolina y 5-hidroxilisina, un derivado de la lisina. Selenocisteína es un caso especial, en el año 1986 fue clasificada como un aminoácido proteico número 21, después del descubrimiento de su codón específico (denominado ópalo) que codifica la inserción de Se-cys a Se-proteínas.

La importancia de los aminoácidos radica en que son la unidad fundamental de las proteínas y el metabolismo de estos puede variar de gran manera dependiendo del organismo que sea estudiado.

1.2.2 Carbohidratos.

Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes sobre la tierra, lo que se debe en gran parte a que cada año la fotosíntesis convierte una inmensa cantidad de CO₂ y H₂O en celulosa y otros productos. Ciertos carbohidratos son materia prima nutricional en muchas partes del mundo

y la oxidación de carbohidratos es la ruta central para la obtención de energía, además, los polímeros de carbohidratos (también llamados glicanos) sirven como elementos estructurales y de protección en las paredes celulares de bacterias, plantas y en los tejidos conectivos de los animales. Otros glicanos lubrican las articulaciones del esqueleto y participan en el reconocimiento y adhesión entre células. Polímeros complejos de carbohidratos se unen covalentemente a proteínas o lípidos y están en gran parte formando la superficie de células procariotas y eucariotas y esto contribuye de una manera muy activa e importante en la comunicación celular[7].

Los carbohidratos son polihidroxialdehídos o cetonas, o sustancias que llegan a tales compuestos por medio de hidrólisis. Muchos, pero no todos, los carbohidratos tienen la fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$, algunos también contienen nitrógeno, fósforo o azufre.

Existen tres grandes grupos de carbohidratos: a) monosacáridos o azúcares simples, los cuales consisten en una simple unidad de polihidroxialdehído o cetona; b) oligosacáridos, los cuales consisten en cadenas cortas de monosacáridos; c) polisacáridos, estos tienen 20 o más (pueden llegar a tener cientos o miles) unidades de monosacáridos.

Para estudio de esta clase de metabolitos, se han diseñado diversas estrategias que abarcan una serie de herramientas que van desde instrumentación y metodología analítica hasta diseño de bases de datos. En la Fig. 2 se reconocen algunas de las técnicas utilizadas para el estudio de azúcares y sus conjugados con biomoléculas y una idea de la cantidad de información que proporcionan[8].

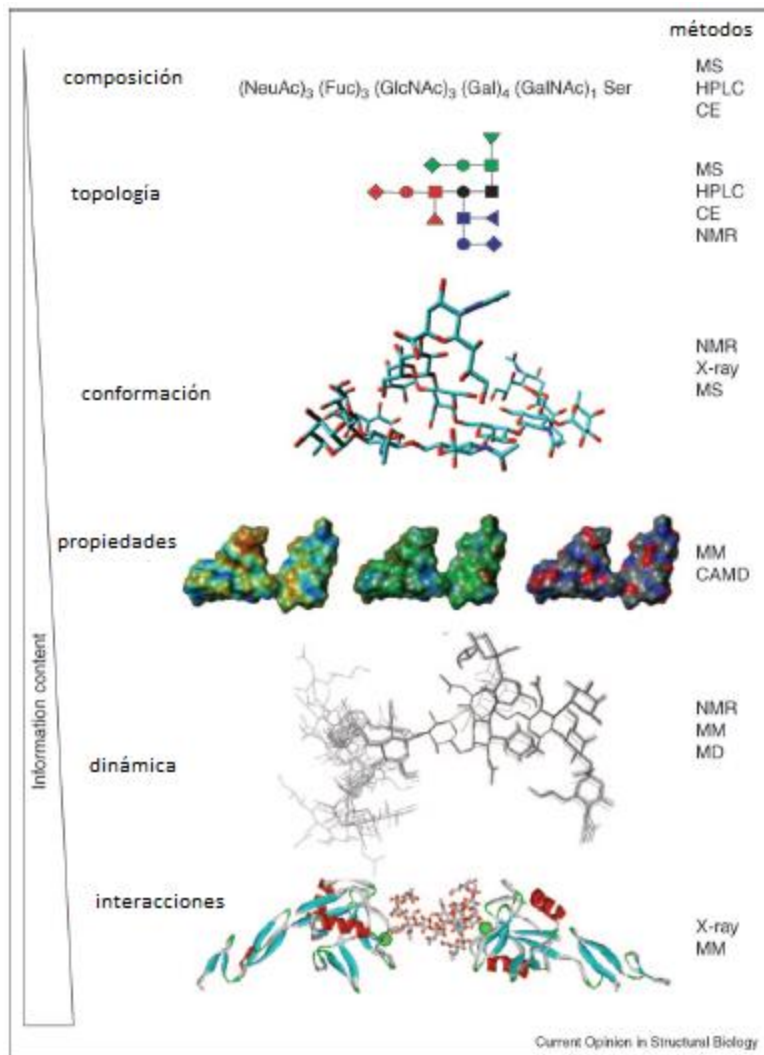


Fig. 2. Esquema del contenido de información a diferentes niveles de datos estructurales de glicanos. MS, espectrometría de masas. CAMD, diseño molecular asistido por computadora. CE, electroforesis capilar. MM, mecanismo molecular[8].

1.2.3 Nucleótidos.

Los nucleótidos tienen una variedad de roles en el metabolismo celular. Ellos son la moneda energética en el metabolismo celular, los esenciales enlaces químicos en las respuestas de células a hormonas y otros estímulos extracelulares, además de componentes estructurales de un arreglo de componentes de co-factores enzimáticos e intermediarios metabólicos. Y por último, son los

constituyentes de los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácidos ribonucleicos (ARN).

En cuanto a la estructura química de los nucleótidos, estos tienen tres componentes característicos: una base nitrogenada, una pentosa y un fosfato. Esto se muestra en la figura 3.

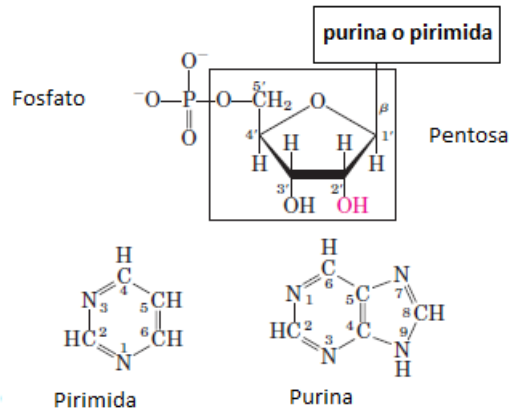


Figura 3. Estructura de un nucleótido.

El ADN y ARN contienen dos bases puricas; adenina y guanina, y dos pirimidias. En el ADN y ARN una de las piridinas es citosina pero la segunda no es la misma para ambos ácidos; es timina en ADN y uracilo en ARN.

1.2.4 Lípidos.

Los lípidos son un grupo químicamente muy diverso, pero su más notable característica es su insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son tan diversas como su química. Las grasas y aceites son la principal forma de almacenaje de energía en muchos organismos. Los fosfolípidos y esteroides son los elementos estructurales en las membranas biológicas. Otros lípidos que están presentes en cantidades relativamente pequeñas juegan roles cruciales como cofactores de ciertas enzimas, acarreadores de electrones, pigmentos, anclas hidrofóbicas para proteínas, agentes emulsificantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares.

Debido a la diversidad de las funciones que muestran estas moléculas, y a que algunas de estas actúan como metabolitos secundarios, manifestándose de manera agresiva ante ciertos mecanismos de estrés, hemos de abordar el tema con un cierto análisis más profundo que los anteriores metabolitos.

Empezaremos por describir los lípidos de almacenamiento, estos que sirven como reserva de energía. Para esto describiremos los ácidos grasos que son ácidos carboxílicos con cadenas de hidrocarburos que van de los 4 hasta los 36 carbonos. Algunos de ellos pueden tener uno o más dobles enlaces entre átomos de carbono, o sea, ácidos grasos insaturados. La figura 4 nos muestra la estructura química de dos ácidos grasos sencillos.

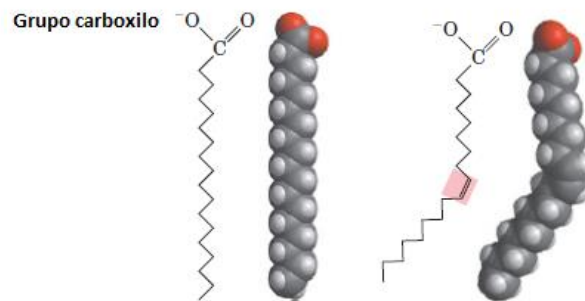


Fig. 4. Estructura general de un ácido graso.

El lípido más simple construido de ácidos grasos es el triacilglicerol. Este está constituido por una molécula de glicerol y unido a ella tres ácidos grasos. La Fig. 5 muestra la estructura de este lípido.

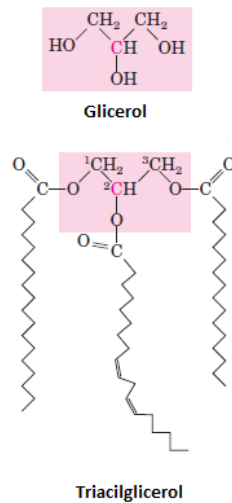


Fig. 5. Estructura de un triacilglicerol.

En la mayoría de las células eucariotas los triacilgliceroles forman pequeñas gotas hidrofóbicas dentro del citosol sirviendo como depósito de combustible metabólico. En vertebrados hay células especializadas llamadas adipositos con una gran capacidad de almacenar estas gotas hidrofóbicas compuestas por triacilglicerol. El triacilglicerol también es almacenado en semillas de muchos tipos de plantas como reserva energética.

En cuanto a la estructura de la membrana, su principal característica es la doble capa lipídica. Ahora describiremos cinco tipos de lípidos que se encuentran en la membrana celular: a) glicerofosfolípidos, en los cuales, las regiones hidrofóbicas están compuestas por dos ácidos grasos unidos a un glicerol; b) galactolípidos y sulfolípidos, los cuales también contienen dos ácidos grasos esterificados a glicerol pero falta el característico fosfato de los fosfolípidos; c) tetraéter lípidos, en el cual dos cadenas largas son enlazadas como éter a glicerol en ambos extremos; d) esfingolípidos, en los cuales un simple ácido graso es enlazado a una grasa aminada, esfingosina; e) esteroides, compuestos caracterizados por un rígido sistema de cuatro anillos de hidrocarburo fusionados.

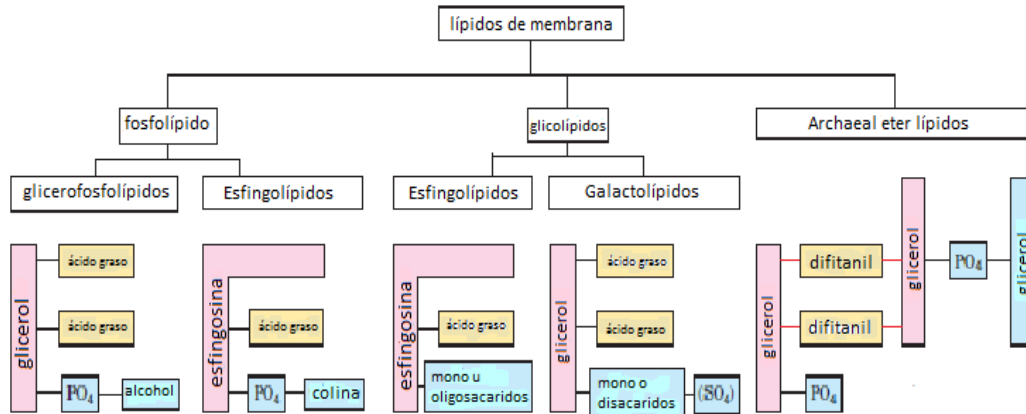


Figura 6. Estructura de los lípidos asociados a membrana celular[9].

Otro grupo de lípidos que se encuentran en menor cantidad pero que tienen un rol activo en el tráfico metabólico como metabolitos secundarios y mensajeros son los esteroides o eicosanoides que pertenecen a las hormonas lipídicas; mientras que otros funcionan como cofactores de enzimas en reacciones de transferencia de electrones en los cloroplastos y mitocondrias o en la transferencia de fracciones de azúcar en una variedad de reacciones de glicosilación. También puede haber lípidos que desarrollan sus funciones como pigmentos.

Una vez presentada a *grosso modo* la diversidad de lípidos como metabolitos, queda claro que la estrategia adoptada en un estudio lipidómico tiene que ser adoptada/diseñada acorde a los objetivos que pueden ser tanto específicos como no específicos. Dependiendo de cuál sea nuestra búsqueda podremos usar una variedad de técnicas y procedimientos ya establecidos[9]. La Fig. 7 nos muestra un resumen gráfico de algunas posibilidades que tenemos al manejar un experimento en el área de lipidómica[10].

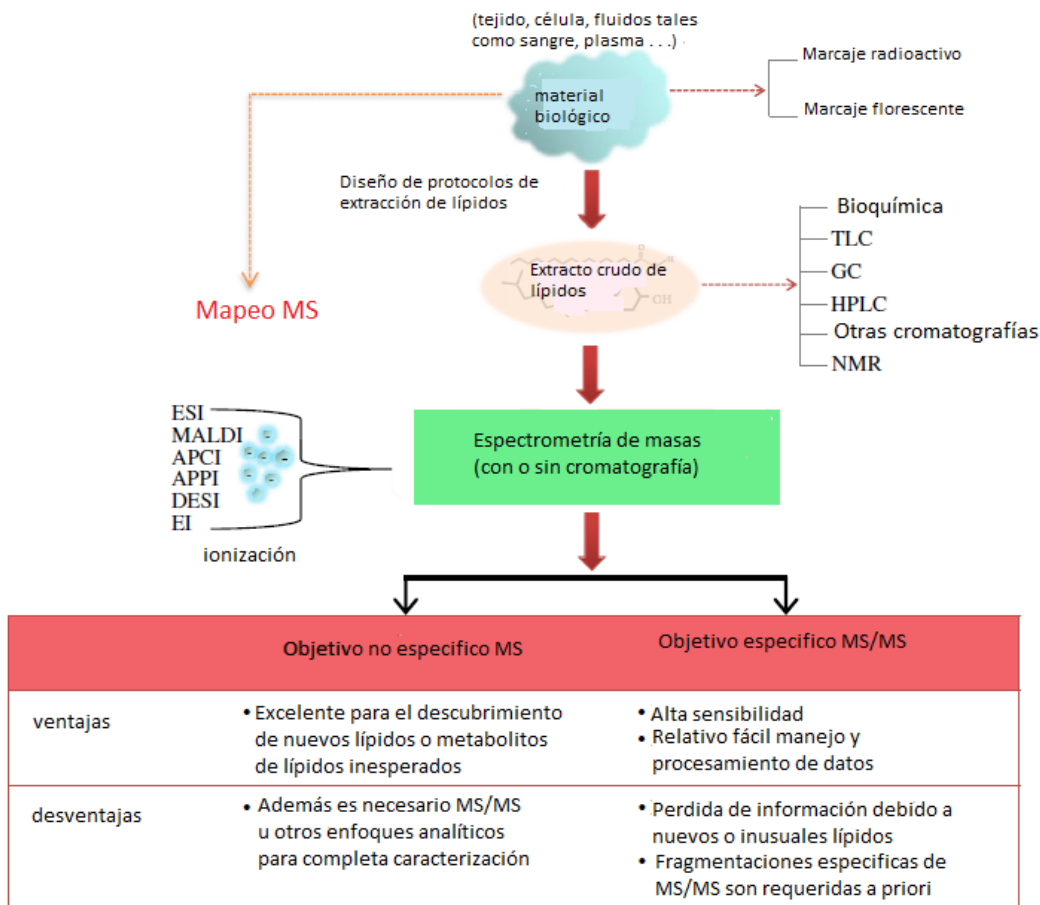


Figura 7. Típico flujo de trabajo en lípidómica[10].

1.3 Estrés en organismos vivos.

De manera general, el estado de estrés en un organismo vivo se puede describir como la suma de reacciones biológicas a cualquier estímulo adverso, interno o externo que provoca una disrupción de la homeostasis metabólica.

Algunos organismos, por ejemplo las plantas y algunas bacterias, no tienen la capacidad de escapar de su hábitat por lo que su supervivencia depende de una red de sistemas interconectados para una más rápida percepción de señales y reacción a condiciones no óptimas de su entorno, respecto a los animales. Dentro de esta intrincada maquinaria de defensa tenemos desde mensajeros, como lo son las hormonas, hasta su interacción con proteínas (enzimas) y todos con el objetivo de combatir estas condiciones de estrés[11].

El estrés biótico, que se deriva de la interacción huésped-patógeno, es gobernado por cientos de genes que terminan con un arreglo de biomoléculas de tal manera que, a partir de mecanismos de defensa, se produce la resistencia del organismo a este tipo de estrés. Así estos objetivos bioquímicos han revelado muchos mecanismos por los cuales las plantas resisten estrés biótico. Después de su descubrimiento, los metabolitos relacionados con la resistencia pueden ser localizados en sus rutas metabólicas, para un mejor entendimiento de su regulación y los genes correspondientes pueden ser identificados en bases de datos biológicas[12].

En cuanto al estrés abiótico tenemos varios factores medioambientales que pueden desencadenar estas respuestas de defensa/resistencia como lo son: temperatura, estrés oxidativo, salinidad y estrés osmótico, sequía, estrés mecánico y estrés provocado por presencia de los llamados metales pesados[11]. Si bien todos estos factores de estrés no desencadenan las mismas respuestas, sí son combatidos por mecanismos que a veces son comunes como lo son activación de proteínas cinasas, dando origen a mensajeros secundarios además que muchos de estos estímulos es común la producción de especies reactivas de oxígeno[11].

Ahora lo que nos importa en este trabajo es este último tipo de estrés llamado estrés abiótico y para ser más específico el estrés abiótico causado por Cr(VI).

1.4 Metabolitos secundarios.

Una vez descrito muy brevemente lo que es el estrés, abordaremos un grupo de compuestos orgánicos llamados metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios a diferencia de los metabolitos mencionados anteriormente, que podremos denominar como metabolitos primarios, no parecen tener un papel reconocido en el crecimiento y desarrollo de los organismos, sin embargo se manifiestan en respuesta a ciertos estímulos estresantes.

Los metabolitos secundarios constituyen una clase de compuestos altamente valiosos debido a sus posibles aplicaciones en el campo de la salud, por ejemplo, pueden ser utilizados por la industria farmacéutica (antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores) y en la industria de los agroquímicos (pesticidas, insecticidas).

Ahora bien, ya que el campo del metabolismo secundario es muy amplio nos detendremos para hacer un análisis más detallado en aquel grupo de metabolitos secundarios que se han identificado tienen un rol importante en la homeostasis redox de las células, este equilibrio puede romperse en la presencia del estrés abiótico, después pasaremos al metabolismo secundario de organismos más complejos como lo son las plantas y el transporte de estos compuestos.

Los metabolitos secundarios con propiedades pro-oxidantes y redox moduladoras forman un grupo diverso estructuralmente hablando, cada uno de ellos con su propia actividad química y es necesario esbozar un esquema donde pro-oxidantes y anti-oxidantes no son necesariamente malos y buenos, sino que cada uno puede cumplir con un objetivo específico en la regulación celular.

Uno de estos grupos son los isotiocianatos orgánicos (ITCs), incluyendo benzilisotiocianato, β -feniletil isotiocianato y alilisotiocianato que se manifiestan como metabolitos secundarios de plantas, especialmente de la familia de las *Brassicaceae*. Una vez formados los ITCs, reaccionan fácilmente con grupos tiol y amina presentes en biomoléculas lo que se convierte en una importante vía de regulación de proteínas y enzimas[13]. El xantohumol de *Humulus lupulus* está ampliamente relacionado con propiedades quimiopreventivas y antioxidantes, inhibición de enzimas ciclooxigenasas. Otro metabolito secundario es la plicianina de *Pseudomonas aeruginosa* que es responsable del daño en las vías respiratorias en humanos ya que eleva los niveles de las ROS en los neutrófilos provocando la apoptosis de estas células[13].

Las vacuolas de almacenamiento, ocupan entre un 40 a 90% del volumen interno de las células en las plantas y juegan un rol importante en la acumulación de metabolitos secundarios. Dos mecanismos son nombrados como los principales transportadores de metabolitos secundarios

vacuolares; a) Transporte secundario dependiente del gradiente de H^+ vía H^+ antiporte y transportadores ABC (ATP-binding cassette)[14].

Los transportadores ABC están conformados por una gran familia de proteínas que es encontrada en organismos que van desde bacterias hasta humanos. Se ha demostrado que los transportadores ABC no solo están relacionados con la des-toxificación de los organismos (metabolitos secundarios endógenos) sino también participan en procesos biológicos específicos tales como señalización celular[15].

Un ejemplo que da una idea más clara de la importancia de estos transportadores y su relación con la homeostasis de la célula es el caso de los metabolitos secundarios del grupo de compuestos fenólicos. Estos compuestos tienen un rol en la interacción de patógeno planta, además actúan como antioxidantes y protectores en estrés abiótico. Se han encontrado compuestos fenólicos glicosilados en vacuolas en la células de plantas lo que nos indican una posible de-toxificación de la célula de estos compuestos[14].

1.5 Cromo como un factor del estrés abiótico

1.5.1 Cromo en el medio ambiente.

El cromo (Cr) es un metal de transición que se encuentra localizado en el grupo VI de la tabla periódica, su número atómico es 24 y su masa molar es 52 g/mol. De manera natural, el cromo es distribuido en las rocas, los animales, las plantas, polvo y gases volcánicos. Ocupa el lugar número 17 en la abundancia natural en la corteza terrestre [16]. En estado metálico es de color blanco plateado, duro y quebradizo. Es relativamente suave y dúctil cuando no está tensionado o cuando está muy puro. El cromo posee cuatro isótopos estables distribuidos en la naturaleza: ^{50}Cr (4.35%), ^{52}Cr (83.78 %), ^{53}Cr (9.50%) y ^{54}Cr (2.37%) [17]. Los estados de oxidación que comúnmente presenta van desde -2 hasta +6, el cromo elemental no se encuentra en la naturaleza,

siendo las formas trivalente (Cr(III)) y hexavalente (Cr(VI)) los estados de oxidación más estables del cromo en la naturaleza [18]. El cromo divalente (Cr (II)) es inestable, debido a que es fácilmente oxidado a la forma trivalente por el oxígeno atmosférico [19, 20].

El cromo se obtiene a partir de la cromita (FeCr_2O_4), mediante un proceso en el cual se calienta la cromita en presencia de aluminio o silicio (mediante un proceso de reducción). Aproximadamente la mitad de la cromita se extrae de Sudáfrica, también se obtiene en grandes cantidades en Kazajistán, India y Turquía [21].

Los compuestos de cromo son muy utilizados en diferentes procesos industriales. El cromo se utiliza principalmente en metalurgia para aportar resistencia a la corrosión y un dar un acabado brillante a los productos. De ahí su extenso uso en el acabado de vehículos [22]. Algunas aleaciones de acero inoxidable contienen más de un 12% en cromo, aunque las propiedades antioxidantes del cromo empiezan a notarse a partir del 5% de concentración [23].

Algunas sales de Cr(VI) (cromatos) y óxidos de cromo se emplean para la elaboración de colorantes y pinturas. En general, las sales de cromo se emplean, debido a sus variados colores, como mordientes. Para preservar la madera se suelen utilizar sustancias químicas que se fijan a la madera protegiéndola. Entre estas sustancias se emplea óxido de cromo hexavalente (CrO_3) [22, 24, 25].

Es común el uso del cromo y de alguno de sus óxidos como catalizadores, por ejemplo, en la síntesis de amoníaco (NH_3). El mineral cromita (FeCr_2O_4) se emplea en moldes para la fabricación de ladrillos (en general, para fabricar materiales refractarios). Cuando en el corindón ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) se sustituyen algunos iones de aluminio por iones de cromo se obtiene el rubí; esta gema se puede emplear, por ejemplo, en láseres. El dióxido de cromo (CrO_2) se emplea para fabricar las cintas magnéticas empleadas en las casetes, dando mejores resultados que con óxido de hierro (Fe_2O_3) debido a que presentan una mayor coercitividad [21].

En otro sentido, el dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) es un potente agente oxidante que se emplea en diversos procesos químicos, en la limpieza de material de vidrio de laboratorio y, siendo el

estándar primario se utiliza también en análisis volumétricos, como agente titulante. Como resultado de la gran cantidad de actividades industriales en las que se emplean compuestos de Cr(VI), se tiene estimado que la descarga mundial anual de dicromato es de 239 000 toneladas [26].

Otro campo de las aplicaciones de cromo es el proceso de curtido de las pieles, cuyo principal objetivo es suavizar y mejorar la apariencia de la piel. Para ello, al líquido de curtido se agrega sulfato básico de cromo(III) o $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5\text{SO}_4$, con la finalidad de permitir la formación de enlaces de coordinación entre el Cr(III) y los grupos carboxilo de las cadenas transversales de colágeno [27, 28]. La cantidad de cromo necesaria para obtener una piel bien curtida es aproximadamente 3 g de Cr_2O_3 por 100g de piel [29]. De ahí que, se tiene estimado que la industria del curtido de pieles utiliza aproximadamente el 40% de la cantidad de cromo total que se produce en el mundo [30].

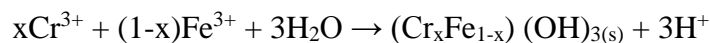
Como se mencionó anteriormente, los estados de oxidación más estables del cromo en la naturaleza son el cromo trivalente (Cr(III)) y hexavalente (Cr(VI)) [18]. Dependiendo de su estado de oxidación, el cromo puede ejercer diferentes efectos en los organismos vivos. Se ha demostrado que los compuestos de Cr(VI) son de 10 hasta cien veces más tóxicos que los de Cr(III), además de que se tiene reportado que el Cr(VI) es mutagénico y carcinogénico [31, 32]. En este sentido, la contribución relativa de Cr(III) y de Cr(VI) en diferentes compartimentos del medio ambiente depende de la fuente del elemento (minerales naturales, fuentes antropogénicas) y de los parámetros físicoquímicos del medio, tales como el potencial redox, pH, presencia de agentes complejantes, etc. [33]. La relación entre los estados hexavalente y trivalente de cromo es descrita por la siguiente ecuación [19]:



Relativamente alto valor del potencial estándar de reducción de Cr(VI) a Cr(III) se ve reflejado en el alto poder de oxidación de cromo hexavalente. En la solución acuosa, las especies de

Cr(III) son termodinámicamente más estables que las de Cr(VI), principalmente debido al potencial necesario para provocar la oxidación [16]. Es por ello que, rara vez ocurre la oxidación de cromo Cr(III) en sistemas biológicos. Por su parte, las condiciones en el ambiente celular facilitan la reducción de Cr(VI), la cual se lleva a cabo en las etapas de transferencia de uno o dos electrones [34].

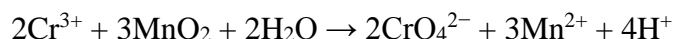
En el medio ambiente, en el caso de aguas naturales, la variedad de especies de Cr(III) incluye iones libres ($\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), hidroxicomplejos ($\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ o $\text{Cr}(\text{OH})_{3(\text{s})}$), complejos mono- y poli-nucleares ($\text{Cr}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+}$ o $\text{Cr}_4(\text{OH})_6^{6+}$) así como los oxianiones (CrO_2^- , CrO_3^{3-}) [16]. En relación al pH, a bajo pH el Cr(III) a menudo se encuentra como $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. A medida que incrementa el pH, las moléculas de agua son reemplazadas sucesivamente con iones hidróxido, hasta que se produce la sustitución de los tres ligantes y ocurre la precipitación ($\text{pK}_{\text{so}}(\text{Cr}(\text{OH})_3) = 28.5$) [35]. De tal modo que, el Cr(III) tiende a precipitar a pH superiores a pH 4, como hidróxido ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) o en forma de hidróxidos mixtos en combinación con otros metales como hierro y aluminio [36-38]. Sin embargo, se ha demostrado que ciertos compuestos, tales como el ácido cítrico, ácido dietilenetriamino pentacético y el ácido fulvico, tiene la capacidad de formar complejos solubles de Cr(III) a pH superiores a 4 (pH entre 6 y 7) [39]. En seguida se presenta la ecuación que ejemplifica la precipitación de Cr(III) por el ion Fe(III), donde x puede variar entre 0 y 1 [16]:



Por su parte, las especies químicas de Cr(VI) son generalmente más solubles en aguas naturales que las de Cr(III) [40]. Es muy importante considerar este factor, ya que en pH neutro y alcalino, el Cr(VI) es altamente biodisponible y de alta movilidad en la naturaleza, lo cual implica un alto riesgo de contaminación. El Cr(VI) en el medio ambiente puede existir como oxianiones tales como cromato (CrO_4^{2-}), bicromato (HCrO_4^{2-}), y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), entre los cuales pueden haber diferentes especies con diferentes grados de protonación dependiendo de pH del medio. En ambientes naturales, cuando la concentración de Cr(VI) es superior a 0.01 M y pH ácido, puede ocurrir la dimerización del ion cromato para generar $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Por su parte, cuando la

concentración de Cr(VI) es inferior a 0.01 M y a valores de pH se hallan entre 3 a 10, las especies predominantes son HCrO_4^{2-} y CrO_4^{2-} .

En suelos, los valores típicos de cromo total en regiones no contaminadas se encuentran en un rango de 30 a 300 $\mu\text{g/g}$ [41]. Sin embargo, los niveles de Cr(III) y de Cr(VI) aumentan principalmente a causa de la inadecuada disposición de los desechos industriales que contienen cromo. En este renglón, debido al supuesto de que las especies de Cr(III) son termodinámicamente estables, una práctica comúnmente realizada en varios países, a los desechos de las tenerías ha sido su confinamiento al aire libre [42]. Sin embargo, se han detectado niveles considerables de Cr(VI) en aguas superficiales y subterráneas de este tipo de depósitos en India, China, Australia [16]. En este tenor, se ha demostrado que el Cr(III) al estar en contacto con óxido de manganeso (MnO_2) y bajo las condiciones adecuadas de humedad, temperatura y acidez (pH 5 aproximadamente), el cromo trivalente puede ser oxidado a Cr(VI) [43]. En la siguiente ecuación se presenta la reacción de oxidación de Cr(III) por MnO_2 [16, 30]:



En el aire los niveles normales de cromo, se hallan entre 10-50 g/m^3 [41]. En sitios próximos a zonas contaminadas con cromo, en el aire pueden encontrarse partículas de Cr(VI) y Cr(III) de aproximadamente 0.2-10.0 μm de diámetro. Las cuales pueden ser respiradas y acumularse en los pulmones de los seres vivos que están expuestos [44].

El tener una clara idea del grado de biodisponibilidad de las diferentes formas de cromo para los organismos vivos es de suma importancia. Por tal motivo, en la siguiente sección se describe brevemente algunos aspectos de la relación entre el cromo y los seres vivos.

1.5.2. Cromo en organismos vivos.

Desde hace algunos años es bien conocido que los llamados metales pesados tienen efectos nocivos en la salud de humanos y otros mamíferos; no solamente los elementos clasificados

como tóxicos, pero también los que son benéficos pueden causar efectos adversos al presentarse fuera del rango de su esencialidad.

Uno de los mecanismos de toxicidad ocasionada por metales pesados más estudiados es el estrés oxidativo. Este estrés se presenta cuando hay un desbalance entre la producción y neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS, el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo, son productos naturales de la respiración mitocondrial, por los que los organismos cuentan con varios sistemas de neutralización de estas especies altamente reactivas y nocivas en el ambiente celular. Si estos mecanismos (enzimáticos y no-enzimáticos) pierden su eficacia, las ROS se forman en exceso causando daños oxidativos a la célula, por ejemplo pueden derivar en lesiones al ADN y posteriormente en mutagénesis.

Además del daño que pueden causar a macromoléculas, hay evidencia de que las ROS también están involucradas en la señalización celular actuando como segundos mensajeros[45]. Algunos ejemplos de estructuras reguladoras redox en la señalización molecular son: los grupos tiol en algunas enzimas (fosfatasa), grupos tiol como sensores de H_2O_2 , en grupos tiol con estructuras enlazadas a zinc y grupos selenol como sensores de H_2O_2 .

Muchas rutas de señalización han sido identificadas como reguladores redox vía oxidación reversible y reducción de grupos tioles. Esto muestra claramente que el estatus redox dentro de la célula es crucial para el correcto funcionamiento de muchas enzimas; por otro lado las alteraciones en el estatus redox pueden servir como un mecanismo de señalización para activar o desactivar distintos señalamientos o rutas de reparación de ADN.

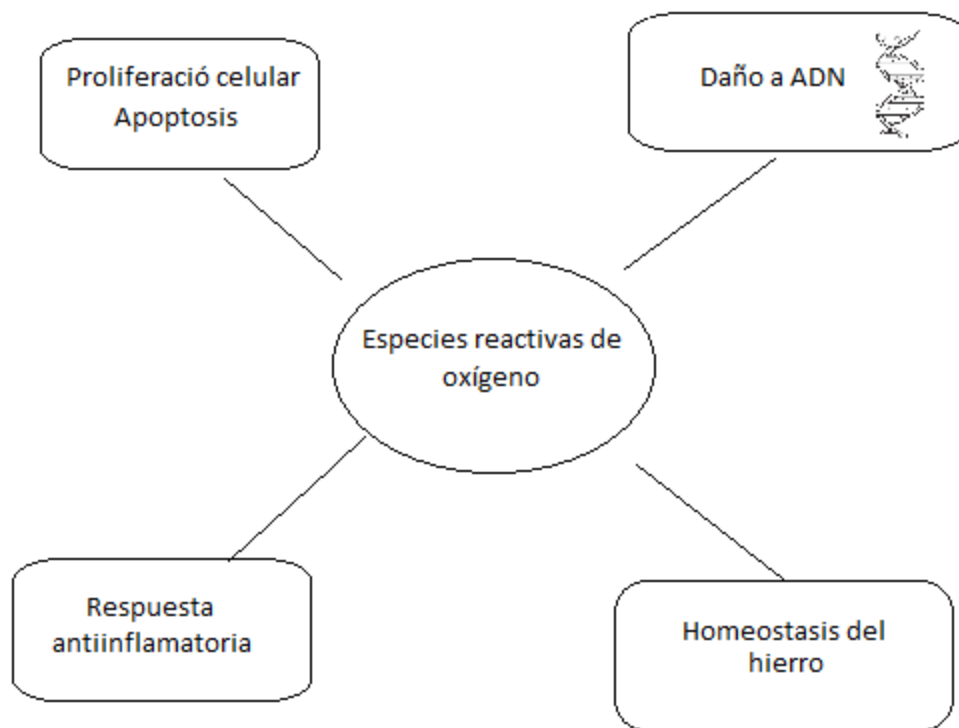


Fig. 8 Respuestas inducidas debido a la proliferación de ROS.

En el caso del Cr , ha sido propuesto que la formación de aductos de Cr(III) con el ADN tiene un importante rol en la generación de inestabilidad genómica; esto en adición a los efectos de genotoxicidad causados por las especies formadas durante la reducción intracelular del Cr(VI) . En particular, se ha demostrado que el Cr(VI) activa rutas de transducción sensibles a las condiciones redox.

En algunos sistemas puede haber una des-toxificación del Cr(VI) al exterior de la célula, llevándose a cabo una reducción a Cr(III) que por su parte es poco permeable por membranas disminuyendo casi totalmente acceso a la célula.

En el caso del Cr(VI) , la similitud del ion cromato y del ion sulfato facilita su entrada a través de los canales de sulfatos (Figura 9). Una vez dentro de la célula el Cr(VI) no exhibe habilidad para dañar el ADN directamente y su efecto genotóxico se relaciona con el proceso de reducción.

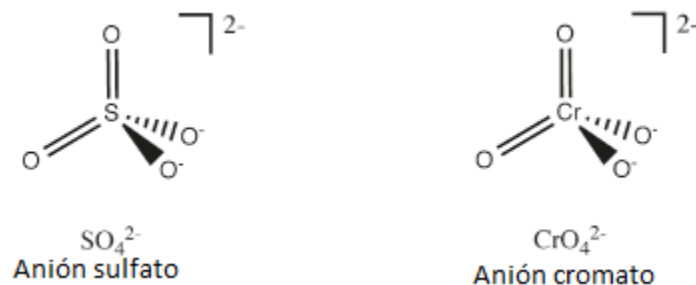


Figura 9. Estructura del ion sulfato y del ion cromato.

El metabolismo celular del Cr(VI) puede causar ambos tipos de daño al ADN; oxidativo y no oxidativo. El más abundante y específico tipo de daño es la formación de aductos Cr(III)-ADN los cuales han sido detectados en reacciones de reducción *in vitro* en varios cultivos de células e *in vivo*. Los aductos de ADN son un grupo heterogéneo que incluyen aductos binarios [Cr(III)-ADN] y ternarios [Ligando-Cr(III)-ADN] donde el ligando puede ser ascorbato, glutatión, cisteína o histidina. Otro aducto que está en cantidades próximas a solo el 0.1% de los aductos son los que se forman con proteínas[46].

Una vez visto el daño que causan a nivel celular, podemos enfocarnos en el daño causado a organismos como los son las plantas. La primera etapa de interacción de cromo con la planta es durante su captación que depende fuertemente de especiación actual de Cr en medio en el que crece la planta. Como ya fue mencionado antes, el Cr(VI) presenta una mayor biodisponibilidad y por ello es considerado más tóxico respecto al Cr(III).

El cromo se mueve principalmente por el xilema de las plantas; se ha reportado una mayor concentración de Cr en las raíces respecto a las partes aéreas de la planta, lo que indica que los mecanismos defensivos se activan inmediatamente después de la captación del elemento de tal manera que el cromo es inmovilizado en las vacuolas de las células que se encuentran en las raíces [47].

Una vez dentro de la planta, el estrés provocado por el cromo es uno de los factores más importantes que afectan la fotosíntesis en términos de la fijación de CO_2 , transporte de electrones,

fosforilación y actividades enzimáticas. Otro efecto observado es el cambio respecto al estatus del agua en la planta, ya que el Cr afecta la resistencia difusiva y el contenido relativo de agua así como su nutrición mineral y actividades enzimáticas[47].

1.5.3. Uso de microorganismos en la neutralización/remoción de Cr(VI)

Los ambientes contaminados con Cr tienen que ser tratados para eliminar o estabilizar las especies contaminantes. Se ha reportado un sinnúmero de procedimientos viables para el tratamiento de Cr(VI) en suelos contaminados, en residuos industriales o en sistemas acuáticos y este tema ha sido discutido en recientes artículos de revisión [48-50]. Existe un consenso que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) no solamente disminuye la concentración de la forma más tóxica, pero también facilita la estabilización del elemento o su eliminación, ya sea por precipitación de Cr(OH)_3 en condiciones cercanas a pH neutro, mediante formación de complejos con ligandos orgánicos y su sorción en fase sólida de carácter abiótico, la inmovilización en la biomasa microbiana o lenta transformación en especies insolubles [48, 51, 52]. De manera general, los procedimientos de reducción de Cr(VI) se pueden clasificar en dos grupos: (1) aquellos basados en el uso de agentes químicos y (2) los basados en el uso de organismos vivos (microorganismos, o plantas).

Dentro del segundo grupo de procedimientos, se han utilizado diferentes tipos de bacterias, levaduras y hongos. Se eligen organismos capaces de sobrevivir y reproducirse en los ambientes contaminados con base en sus mecanismos de defensa, tolerancia y finalmente de adaptación [53]. Los estudios metabólicos son necesarios para entender los mecanismos antes mencionados con el fin de lograr eficiente eliminación o estabilización del Cr(VI) en el medio contaminado, mediante ajuste de las condiciones fisicoquímicas o mediante el uso de herramientas biotecnológicas. En este sentido, uno de los propuestos mecanismos no enzimáticos consiste en la reducción mediante transferencia de electrones desde compuestos orgánicos intra- y extracelulares de baja masa molecular (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, quinonas, vitaminas y ácidos orgánicos – todos ellos metabolitos del organismo) hacia el Cr(VI) [48]. La capacidad de los ácidos orgánicos como donadores de electrones durante la reducción del Cr(VI) ha sido observada en sistemas modelo abióticos, en los suelos y, en mucho menos trabajos, en cultivos microbiológicos [54]. Se ha demostrado que los ácidos cítrico, tartárico, salicílico, ascórbico y

oxálico son capaces de una reducción lenta en condiciones ligeramente ácidas (pH 4-5); sin embargo, el proceso puede ser acelerado en presencia de ciertos compuestos de carácter de co-reductor y en presencia de iones metálicos que ciclan entre sus diferentes estados de oxidación [49, 55-58]. Específicamente, algunos autores han estudiado acción catalítica de ión Mn(II) durante la reducción de Cr(VI) por los ácidos cítrico, ascórbico y ácidos tartárico tanto en soluciones modelo como en los suelos a valores de $\text{pH} < 5$ [49, 58-62].

El uso de plantas y microorganismos de la rizoesfera en la remoción de Cr(VI) pertenece al dominio de fitorremediación, donde se busca que la planta neutralice y capte la mayor posible cantidad de las especies contaminantes en sus partes aéreas para su posterior cosecha, tratamiento o disposición en un lugar adecuado. El éxito de esta estrategia depende del conocimiento y aprovechamiento de los mecanismos moleculares responsables de captación, transformación y acumulación de los contaminantes por un lado y aquellos responsables por la sobrevivencia de la planta por otro lado. Las herramientas de metabolómica son muy útiles en estudios de fitorremediación debido a su capacidad de proveer información relevante para la elucidación de dichos mecanismos.

1.6 Herramientas utilizadas en metabolómica

Debido a que los metabolitos exhiben una gran diversidad química, hasta ahora es imposible medirlos e identificarlos todos en una matriz biológica con una simple y universal técnica. Es por eso que existe una variedad de plataformas y técnicas que nos permiten identificar y cuantificar grupos de metabolitos, tal como se presentó anteriormente en el caso de lipidómica (Fig 7).

Dos de las principales plataformas analíticas que nos dan información estructural relevante son la resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masa (MS) con sus diferentes fuentes de ionización y filtros o analizadores másicos. Cada una de estas herramientas da información complementaria pero también información redundante.

Empezaremos haciendo un breve análisis de la espectrometría de masas, la cual puede ir acoplada a técnicas separativas para poder analizar un gran número de metabolitos incluidos dentro de una

muestra y en una sola corrida. En este caso mencionaremos las plataformas más utilizadas empezando por la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS).

La GC-MS 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, termoestabilidad y una mejora a la resolución además de eliminar el coeluto de algunas sustancias polares. Todas estas características añadidas por el reactivo derivatizante son necesarias para poder obtener una buena separación y posterior identificación de compuestos[63].

En general, los investigadores que utilizan GC-MS lo hacen para hacer un estudio no específico de un grupo de metabolitos. Una posibilidad es el uso de la plataforma AMDIS que se basa en el uso de algoritmos matemáticos de desconvolución que permiten extraer información de un solo compuesto cuando éste se co-eluye con otros o cuando su señal es afectada por alto ruido (bajo valor S/N). La desconvolución permite asignar al compuestos su tiempo de retención en la columna y también permite su identificación mediante el análisis de espectros de masa y la consulta de bibliotecas de espectros de masas; sin embargo las señales “extraídas” por el método de desconvolución no son totalmente compatibles con las obtenidas en el análisis de los estándares de compuestos puros (debido a diferente eficacia de ionización y separación de iones).

Ahora, lo complicado es seleccionar un único valor m/z para poder cuantificar el compuesto de interés, sin interferencias provocadas por el ruido o por presencia de otros compuestos co-eluidos. El problema en la aplicación de desconvolución es que los resultados exportados pueden variar dependiendo de los parámetros elegidos para lograr la desconvolución, en adición, se pierde la sensibilidad en la cuantificación. Una alternativa recomendable es utilizar el modo de monitoreo selectivo de ion(es) (SIM), como un complemento a la desconvolución. Con este complemento se logra una mayor sensibilidad (aumento del valor S/N) ya que se eliminan los iones no buscados y se mejora el proceso de desconvolución haciendo más específica la búsqueda[64].

Pasando a otra técnica de separación la cual es acoplada eficientemente a espectrometría de masas es la cromatografía de líquidos (LC). Esta técnica es versátil, ya que gracias a disponibilidad de una gran variedad de columnas y posibilidad de variar la composición de las fases móviles, se puede llevar a cabo el análisis de una multitud de moléculas con diversos grupos funcionales, amplio rango de tamaño molecular, diferente grado de polaridad, sin y con carga eléctrica, las cuales coexisten en una matriz biológica. A veces, se integran dos, tres o más etapas de separación cromatográfica con el fin de aumentar la selectividad hacia los compuestos de interés.

Una de las grandes ventajas que se tienen en LC-MS es que se han desarrollado métodos para analizar un solo grupo de compuestos de interés, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico es una poderosa técnica para el análisis de carbohidratos, mientras la cuantificación de ácidos orgánicos puede ser llevada a cabo por medio de cromatografía de líquidos de fase inversa.

Inicialmente, la obtención de huellas metabólicas eran a través de LC acoplada a espectrómetros de masas con sistema de ionización suave (por electronebulización, ESI) con detectores de baja resolución tales como triple cuadrupolo o analizadores de trampa iónica. Al final, la interpretación de datos fue limitada por separaciones cromatografías insuficientes y por problemas de identificación.

Los problemas anteriores se han ido resolviendo gracias a la implementación de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) y, por otro lado mediante introducción de espectrómetros de masas de alta resolución con analizadores de masa de tiempo de vuelo (TOF) o mediante la colocación de varios dispositivos en un solo instrumento (principalmente uno a más cuadrupolos y TOF).

Los analizadores de alta y ultra alta resolución han venido incrementando su popularidad en el campo de la metabolómica, porque proveen medidas de masa exacta necesaria como uno de los requisitos para identificar/confirmar compuestos, evitando interferencias de iones “isobáricos”.

Adicionalmente, dispositivos de fragmentación de iones y adquisición de espectros MS^n permiten la caracterización estructural de compuestos, incluyendo la caracterización de algunos isómeros ya que sus patrones de fragmentación son diferentes, con la ventaja de utilizar separadores másicos de bajas resoluciones[65].

Otra de las técnicas de separación acoplada a espectrometría de masas para análisis metabolómicos es la electroforesis capilar (CE), bajo las condiciones de trabajo adecuadas la CE provee separaciones rápidas y altamente eficientes además que es una técnica que funciona muy bien cuando se tienen bajas cantidades de muestra. También tiene alta versatilidad debido a variedad de modalidades de introducción de muestra y parámetros que influyen en la resolución.

La principal desventaja de CE es la pobre sensibilidad que nos proporciona la técnica, sin embargo, una vez acoplada a MS y con el uso de estrategias de preconcentración puede corregir este problema, así, la CE ha sido acoplado a trampa de iones y tiempo de vuelo.

No hay duda que esta baja de sensibilidad, en adición a [la](#) relativamente pobre reproducibilidad y robustez la hace una técnica relativamente débil frente a LC y GC, pero al parecer es muy indicada cuando se trata de metabolitos iónicos débiles o fuertes así como para estereoisómeros los cuales siguen una fácil integración de sistemas de pre-concentración en línea durante la electro-migración[66].

Ahora se muestra una gráfica que ilustra el uso de las técnicas anteriormente descritas a partir del año 2010 al año 2014 (Fig. 10).

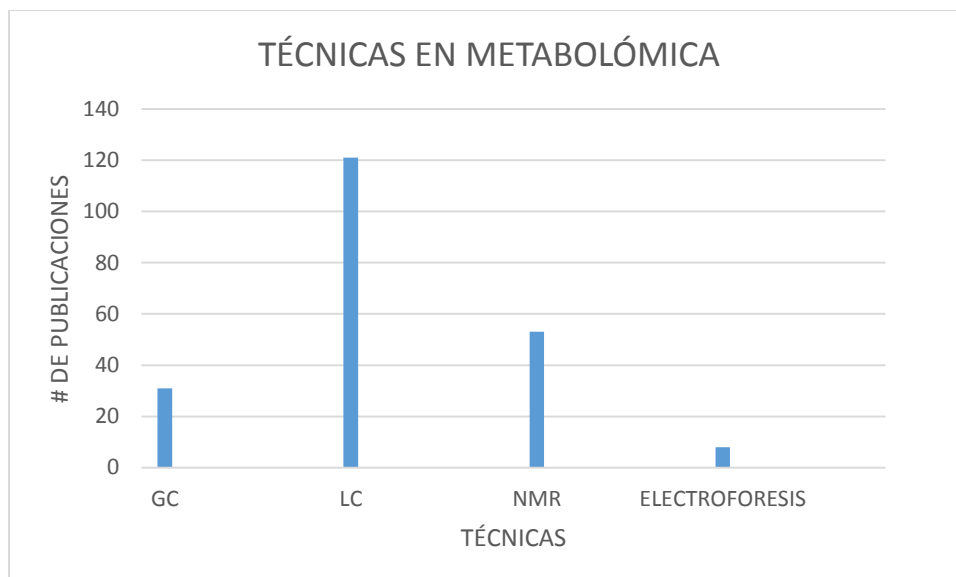


Figura 10. El número de artículos publicados en la base de datos sciencedirect a partir del 2010 hasta el 2014, cuyo título contiene palabras “metabolomics”, “metabonomics” o “metabolites” junto con GC, LC o electrophoresis, o NMR.

En la gráfica se muestra una tendencia hacia el uso de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos debido al avance tecnológico que ha tenido esta plataforma en cuanto al poder de resolución, obteniendo ventajas en cuanto a la identificación de compuestos por medio de esta masa y la cuantificación e identificación de moléculas complejas.

1.8 Justificación

La biorremediación se basa en el uso de organismos vivos o productos de su metabolismo para la neutralización, degradación y/o eliminación de los contaminantes activos [67]. Las principales ventajas de la biorremediación respecto a los tratamientos químicos directos son su fácil manejo, uso de las condiciones químicamente menos agresivas y amigables al medio ambiente, bajo costo y eficacia aceptable. La lista de microorganismos resistentes a metales pesados y/u otros tipos de contaminantes medio ambientales es extensa [68-71], varios de estos organismos son capaces de acumular y/o reducir Cr(VI) [72-74]. Asimismo se ha reportado el uso de las plantas con capacidad de captar y acumular el cromo para los fines de fitoremediación de suelos

contaminados [75, 76]. Los aspectos importantes en los estudios de biorremediación son: (1) la evaluación de captación y del metabolismo de especies de cromo y (2) la elucidación de los mecanismos responsables por defensa, tolerancia y adaptación de estos organismos en las condiciones de estrés causado por cromo. Se considera que ambos aspectos pertenecen al área de metabolómica y forman el tema del presente trabajo.

En concreto, como organismos del estudio se propone utilizar dos tipos de plantas; seleccionando berros y girasol, ya que ambas presentan rápido crecimiento en hidroponía y además, son relativamente resistentes a los llamados metales pesados[77]. Asimismo, se estudiará una cepa de bacterias aislada de suelo contaminado con desechos de curtiduría (*Bacillus cereus*). Los tres tipos de organismos serán expuestos a Cr(VI) y, para fines comparativos, se obtendrán también los controles. En la parte de caracterización analítica, se propone hacer uso de técnicas cromatográficas en acoplamiento con diferentes sistemas de detección con el fin de obtener información sobre participación de metabolitos de los organismos seleccionados en el proceso de reducción de Cr(VI). Una vez establecidas las herramientas del estudio y con base en la revisión bibliográfica[78], uno de los objetivos de este trabajo es obtener evidencias experimentales sobre posible papel facilitador de Mn(II) en la reducción de Cr(VI) por ácidos orgánicos como metabolitos de *B. cereus*.

2 Objetivos.

Objetivo general

Realizar el estudio metabolómico en organismos seleccionados con el fin de obtener nuevos conocimientos en los mecanismos de defensa en las condiciones de estrés abiótico impuesto por Cr(VI).

Objetivos particulares.

1. Demostrar la factibilidad de cromatografía de gases con detección por ionización en flama y con detección por espectrometría de masas para detectar y caracterizar las diferencias entre los perfiles de metabolitos en dos tipos de plantas crecidas en presencia de Cr(VI) respecto aquellos obtenidos para plantas control.

2. Realizar un estudio analítico enfocado en el efecto del ión Mn(II) sobre la reducción del Cr(VI) en cultivo de la bacteria *B. cereus*, aislada de suelo contaminado.

3. Parte Experimental

3.1 Equipo de Laboratorio

a) Purificador de agua :

- Purificador de agua desionizada Milli Q Labconco Water Pro PS

b) Esterilización:

- Autoclave.

c) Crecimiento de bacterias:

- Incubadora de 37 °C para cultivos en medios líquidos, con agitación.

d) Separaciones Cromatográficas:

- Cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer con detector de ionización en flama y controlado por el paquete de software TotalChrom Navigator, versión 6.2.1.

- Columna capilar fue ZB-5 de Phenomenex (30m x 0.25mm x 0.25µm)

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo modelo SCION TQ

- Cromatógrafo de líquidos modelo 1050 de Hewlett Packard con detector espectrofotométrico de onda múltiple, ambos controlados por el paquete de software ChemStation.

Columna eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm)

- Cromatógrafo modelo HP1200, Agilent Technologies detector de arreglo de diodos controlado por el paquete de software ChemStation

e) Cuantificación de cromo por emisión atómica

- Espectrómetro de emisión atómica de Agilent 4100 MP-AES con un nebulizador Mira mist de teflón con cámara de un solo paso y presión del nebulizador de 220 kPa.

f) Análisis por Espectrofotometría Uv-Vis:

- Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic 3000 con arreglo de diodos (resolución 0.35 nm, Milton Roy) equipado con el paquete de software User Data, v. 2.01 de Milton Roy, Inst. Co.
- Celda de cuarzo para espectrofotómetro, volumen de 1000 μL .

3.2. Material de laboratorio

- Mortero con pistilo.
- Cápsula de porcelana.
- Bloque del calentamiento para la digestión de las muestras (Multi-Block, Barnstead/Labline).
- Matraces Erlenmeyer (50, 125, 250, 500).
- Matraces Aforados (10, 25, 50 y 100 mL).
- Frascos IsoLab con tapa rosca (250 y 500mL).
- Vasos de precipitado (10, 50, 100, 500 y 1000 mL).
- Embudos de vidrio.
- Embudo de porcelana.
- Vortex Genie 2.
- Microcentrífuga Denver Instrument.
- Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura).
- Micro espátulas.
- Espátulas.
- Mecheros Bunsen.
- Material de plástico (Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL, tubos de Eppendorf 1.5 ml)
- Micropipetas Eppendorf (0.5-10 μL , 20-200 μL y 200-1000 μL).
- Balanza analítica.

3.3. Estándares, reactivos y disolventes

- a) Reactivos y disolventes

- Ácido láctico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, fosfato monobásico de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, cloruro de sodio, dextrosa, fosfato de potasio dibásico, ácido nítrico, *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA), difenilcarbazida, cloruro de cromo (III) hexahidratado, dicromato de potasio, agua oxigenada al 30 % (reactivos Sigma).
- Acetona, hexano, éter etílico, acetato de isobutilo y acetronitrilo grado HPLC de Fisher

3.4. Material biológico

Las muestras analizadas fueron el medio de cultivo de la bacteria *B. cereus* así como la biomasa de *L. sativum* y *H. annuus*. La cepa bacteriana fue amablemente proporcionada por la profesora Neyla Benítez Campo de la Universidad del Valle en Cali, Colombia; esta cepa fue aislada de los desechos de una tenería en Colombia y posteriormente identificada y caracterizada como resistente a Cr(VI) con capacidad de su reducción [79, 80]. Las semillas de ambas plantas fueron adquiridas en los mercados en Polonia y México, respectivamente.

a) La cepa *Bacillus cereus* fue cultivada en medio de cultivo mínimo con la siguiente composición:

Tabla 2. Composición del medio de cultivo.

Medio de cultivo	
K ₂ HPO ₄	80 mM
KH ₂ PO ₄	44 mM
MgSO ₄ H ₂ O	43 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	91 mM
Glucosa	46 mM
Citrato de sodio	71 mM

El pH del medio fue ajustado a pH 7 con una solución de citratos-fosfatos (citrato de sodio 0.2 M y de fosfato monobásico de potasio 0.8 M). La esterilización del medio se llevó a cabo en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera (atm) de presión durante 15 min. Después de enfriarse, se agregó a cada tubo de muestra 1.75 mL de este medio y fueron inoculados con 100 µL de un medio con crecimiento bacteriano con una densidad óptica de 0.5 a 600 nm e incubados a 37 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) hasta una densidad óptica de 0.5.

Para ensayos de reducción del Cr(VI) en presencia de la bacteria, se tomaron varias alícuotas del inoculo y se les agregó a solución estándar de Cr(VI) para obtener su concentración final 0, 30 y 50 mg/L de Cr(VI); asimismo se agregó también la solución de Mn(II) para tener su concentración final 2.9, 5.9 y 11.8 mg/L. En la Tabla 3 se presentan los volúmenes y concentraciones de los iones y del inoculo en cada una de las muestras.

Tabla 3. Composición de muestras preparadas para ensayos de reducción del Cr(VI) en presencia de bacteria.

Muestra	Concentraciones finales, mg/L		Volúmenes tomados para preparar cada una de las muestras, µL					
	Mn(II)	Cr(VI)	Inoculo*	Mn(II)**	Cr(VI)***	Agua	Medio	Total
control	0	0	100			150	1750	2000
1.1	0	30	100		60	90	1750	2000
2.1	2.9	30	100	5	60	85	1750	2000
3.1	5.9	30	100	10	60	80	1750	2000
4.1	11.8	30	100	20	60	70	1750	2000
5.1	11.8	50	100	20	100	30	1750	2000
6.1	0	30	0		60	90	1850	2000
7.1	0	50	0		100	50	1850	2000

* Alícuota del cultivo de densidad óptica 0.5

** Solución estándar, 1180 mg/L del Mn(II) a partir de MnCl₂ 4H₂O.

*** Solución estándar, 1000 mg/L del Cr(VI) a partir de K₂Cr₂O₇.

b) Para obtener lo que llamamos “medio gastado” se siguió el procedimiento descrito anteriormente, pero una vez que se llegó a la densidad óptica de 0.5 (medida a 600 nm) se centrifugó el medio, se recolectó el sobrenadante y se filtró con un disco de celulosa de tamaño de poro 45 µm. Una vez filtrado el medio (medio gastado) se agregaron las cantidades de Cr(VI)

y Mn(II) descritas en la sección de resultados y se recolectaron las alícuotas a diferentes tiempos de contacto, según se requiera.

c) Para la obtención del material biológico de *L. sativum* y *H. annuus* se siguió el siguiente procedimiento. Semillas de *L. sativum* (cv. Ogrodowa) fueron compradas en un mercado especializado en jardinería en Polonia. Las semillas fueron esterilizadas en 70% de metanol durante 3 min, después fueron tratadas con una solución al 3.1% de hipoclorito de sodio durante 15 min, las semillas fueron enjuagadas con agua desionizada estéril.

Para la germinación hidropónica se utilizó como medio de crecimiento la solución Hoagland la cual contiene nitrato de calcio 0.35 mM, cloruro de calcio 2.1 mM, sulfato de magnesio 0.91 mM, fosfato monobásico de sodio 0.97 mM, nitrato de potasio 1.22 mM, ácido bórico 23 µM, cloruro de manganeso 3.9 µM, trióxido de molibdeno 23 µM, nitrato férrico 10 µM, nitrato de zinc 0.6 µM, sulfato de cobre 0.44 µM, pH 5.8.

Después del periodo de germinación (5 días) las plántulas fueron transferidas para su crecimiento hidropónico en presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI) agregado al medio. Como fuente de Cr(VI) se utilizó una solución de dicromato de potasio de 1000 mg/L, se prepararon 100 mL de medio por bloque de plantas.

Pasados 8 días las plantas fueron cosechadas, se lavaron las raíces con cloruro de calcio a una concentración de 0.05 M para después separar la parte aérea de la raíz. Ambas biomasas fueron homogenizadas con un politron.

3.5 Software

- Microsoft Office 2010
- GRAMS/ 386 TM, version 3.01A (Galatic Ind. Co., Salem, MA)
- ChemStation para controlar el cromatógrafo de líquidos modelo 1100 (Hewlet Packard)
- TotalChrom Navigator, versión 6.2.1 para controlar el cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer
- Software AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System) versión 2.70 para tratamiento de datos obtenidos de espectrometría de masas.

- Software Milton Roy Inst. Co. para adquisición, almacenamiento y tratamiento de datos espectrales.
- Unscrambler, 7.0 Camo, Norway.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la factibilidad de GC-FID junto con GC-MS para la identificación de cambios en el perfil metabólico de los organismos *L. sativum* y *H. annuus* expuestos a Cr(VI).

Como ya se describió en la primera sección de este trabajo, la metabolómica requiere el manejo de una gran cantidad de información y para efectos de poder dar una interpretación correcta de los resultados obtenidos es necesario hacer una síntesis de todos estos datos, para lo cual se utilizan las herramientas del análisis multivariante. Una de estas herramientas es el método de componentes principales (PCA), el cual permite presentar los datos en una reducida dimensionalidad y así poder encontrar posibles asociaciones entre variables de un sistema dado.

Para representar adecuadamente la información obtenida con un número menor de variables, en el PCA estas nuevas variables (componentes principales) se construyen a partir de combinaciones lineales de las variables originales bajo el criterio de una pérdida mínima de información. Esto solo tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables ya que esto indica que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarían gran parte de la variabilidad total.

Una plataforma para obtener esta información (perfiles metabólicos) es la combinación de la cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El hecho de combinar ambas técnicas nos da ventajas, una de ellas es que la respuesta del detector FID depende de la cantidad de átomos de carbón en la molécula del analito y no de la energía de ionización. Otra ventaja del detector FID es la velocidad de escaneo que permite hacer hasta 20 lecturas por segundo, mientras que en espectrometría de masas con un triple cuadrupolo, se hacen 1.47 lecturas por segundo en un monitoreo de lectura completa (full scan monitoring); sin embargo, para fines de identificación y

cuantificación de compuestos, GC-MS ofrece muchas ventajas debido a posibilidad de adquisición de cromatogramas del ion extraído, uso de la técnica de monitoreo de reacciones múltiples así como consultas en las bibliotecas de espectros disponibles comercialmente o elaboradas en el laboratorio.

El objetivo de esta parte de trabajo fue comparar los perfiles de metabolitos de dos plantas, *L. sativum* y *H. annuus* expuestas a Cr(VI) respecto plantas control y detectar los metabolitos potencialmente afectados por la presencia del ion estresante. Para ello, se germinaron las semillas durante 5 días como muestra la sección 3.4 y después, las plántulas fueron transferidas para su crecimiento hidropónico en un volumen de 100 mL de medio Hoagland con concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI) proveniente de una solución de $K_2Cr_2O_7$ de 1000 mg/L. Después de 5 días de exposición a las diferentes concentraciones y un control libre del Cr(VI), se cosecharon las plantas, las raíces fueron enjuagadas con una solución de cloruro de calcio a una concentración de 0.05 M y después con agua milliQ. Se separó la parte aérea de la raíz y se escurrieron hasta que quedaron totalmente secas.

Para la extracción de los metabolitos de la planta se utilizó una solución 10:3:1 de metanol: cloroformo: agua. Se pesaron 0.5 g de la raíz y 2 g de la parte aérea y se les agregaron 2 mL de la solución extractante, después cada una de las muestras se homogenizó con un politron durante 30 segundos, se agregaron otros 3 mL de la solución y se volvió a homogenizar con el politron durante otros 30 segundos. Después se centrifugó (10 min, 14000 g) y se tomó una alícuota de 0.5 mL de sobrenadante, la cual se secó en el Speedvac. Al residuo seco obtenido, se agregaron 500 μ L de piridina y 50 μ L de BSTFA para sililación de los metabolitos (derivatización necesaria para convertirlos en compuestos volátiles y termoestables). Se incubó la muestra durante 30 minutos a 37 °C, después se inyectó en el cromatografo de gases.

En primera instancia las muestras fueron analizadas por GC-FID para obtener los datos que fueron utilizados para el análisis quimiométrico.

Tabla 4. Las condiciones utilizadas en el análisis de extractos de *L.sativum* y *H. annuus* por GC-FID.

CG-FID Perkin Elmer, Clarus 500	
Columna	ZB-5, longitud 30 m, 0.25 μ m de grosor de película
Gas acarreador	Hidrógeno
Flujo en la columna	1.6 mL/min
Inyección	split 1:10 volumen: 1 μ L
Volumen de inyección	1 μ L
Temperatura de inyector	240 °C
Programa de temperatura en el horno	Temp. Inicial 70 °C, 1 min. 10°C/min hasta 300 °C, 3 min.
Temperatura del detector	320 °C
Gases del detector	Aire: 450 mL/min H ₂ : 45 mL/min

Cromatogramas típicos GC-FID obtenidos en el análisis de los extractos de plantas se presentan en la Figura 11. Para analizar estos cromatogramas se tomaron en cuenta los picos que presentaban la relación señal/ruido (S/N) arriba de 20. Después se alinearon los cromatogramas y se obtuvieron áreas de los picos cromatográficos. Los resultados obtenidos revelaron diferencias entre intensidad de las señales de varios picos cromatográficos, entre cultivos de la misma planta, dependiendo de la presencia y concentración de Cr(VI) en el medio.

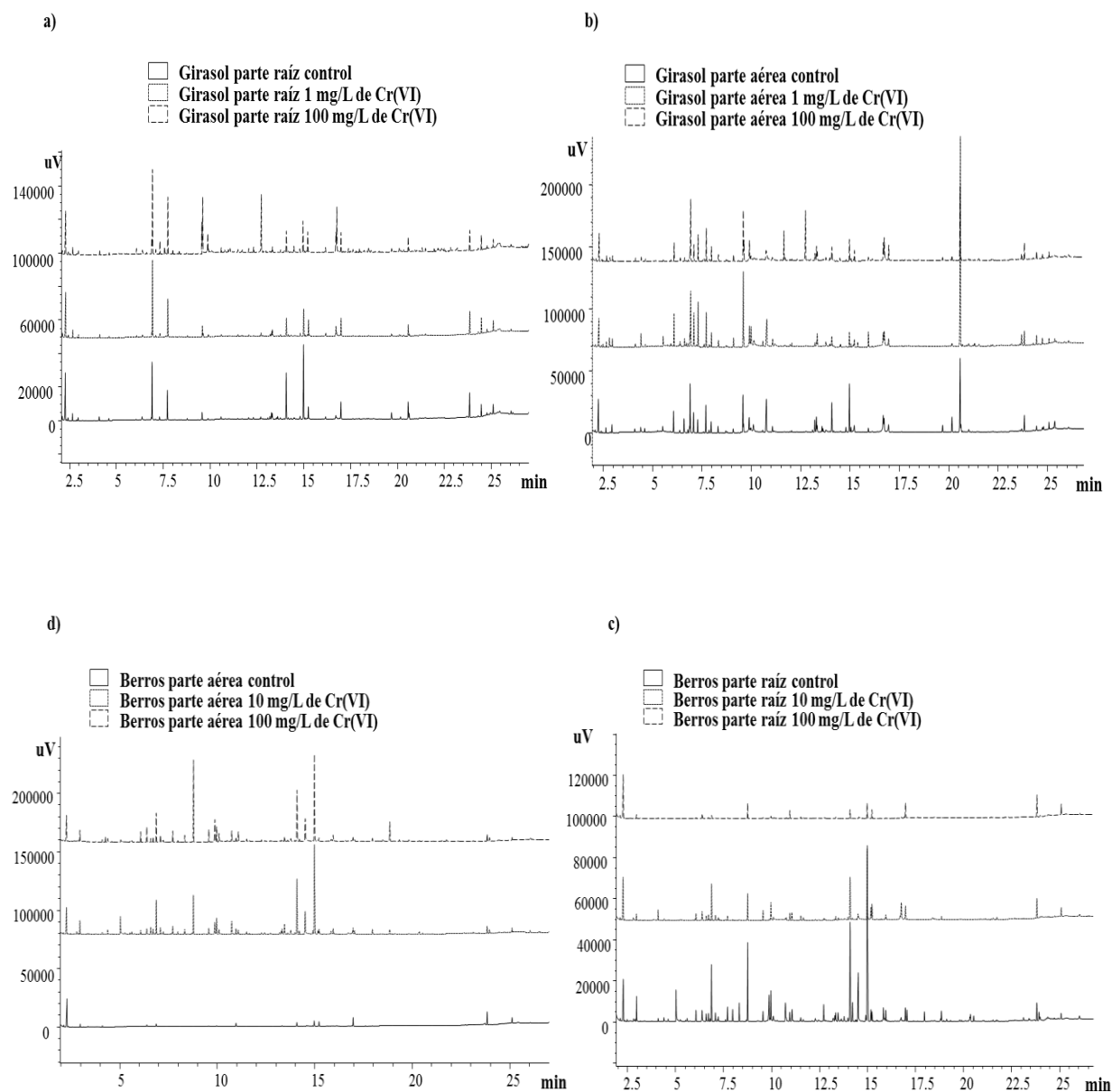


Figura 11. Cromatogramas típicos GC-FID de compuestos extraídos de plantas crecidas en presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI) en medio de cultivo, obtenidos después de la derivatización pre-columna con BSTFA.

a) Raíces de girasol; b) parte aérea de girasol; c) parte aérea de berros; d) raíces de berros.

Para observar en el espacio bidimensional la estructura de los datos obtenidos, se llevó a cabo el análisis PCA. Para cada una de las condiciones de crecimiento del girasol (planta control, 1, 10, 50 mg/L Cr(VI)) se tomaron como variables los tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis de extractos de raíces y de partes aéreas. En el modelo PCA obtenido, los dos primeros componentes principales describieron 74% de la varianza total de los datos, confirmando la significancia estadística de este modelo. En la Figura 12 correspondiente a “scores plot”, se observa la distribución de muestras en el espacio de dos primeros PCs, de los cuales el PC1 permite distinguir entre raíces y la parte aérea de la planta y el PC2 está relacionado con las condiciones de exposición (correlación negativa con plantas control y positiva con las plantas expuestas a Cr(VI)).

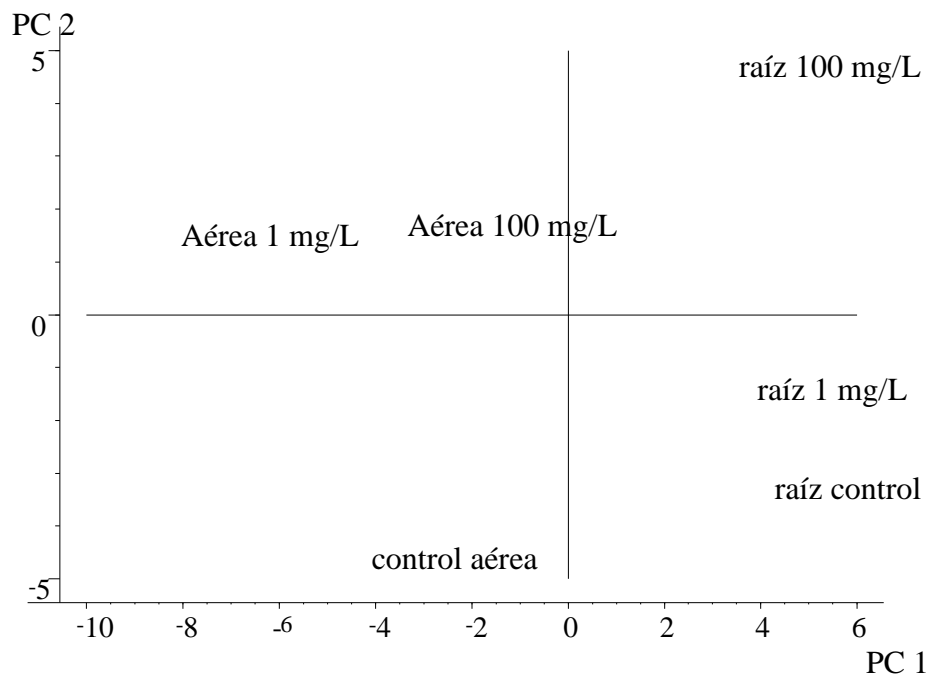


Figura 12. Grafica que representa en un espacio bidimensional la distribución de las muestras de *H. annuus* (scores plot). Las variaciones explicadas por los dos componentes son de 56% y 18% para PCA1 y PCA2 respectivamente.

En la parte aérea, las muestras que fueron expuestas a Cr(VI) muestran similitudes, mientras que la muestra control está alejada de esta agrupación de muestras, lo que nos indica diferencias entre los perfiles metabólicos de ambos grupos. En cuanto a la parte raíz se agrupan la muestra control

y la muestra expuesta a 1 mg/L de Cr(VI) lo que nos indica que los cambios son menos evidentes a concentraciones bajas pero notorios en 100 mg/L.

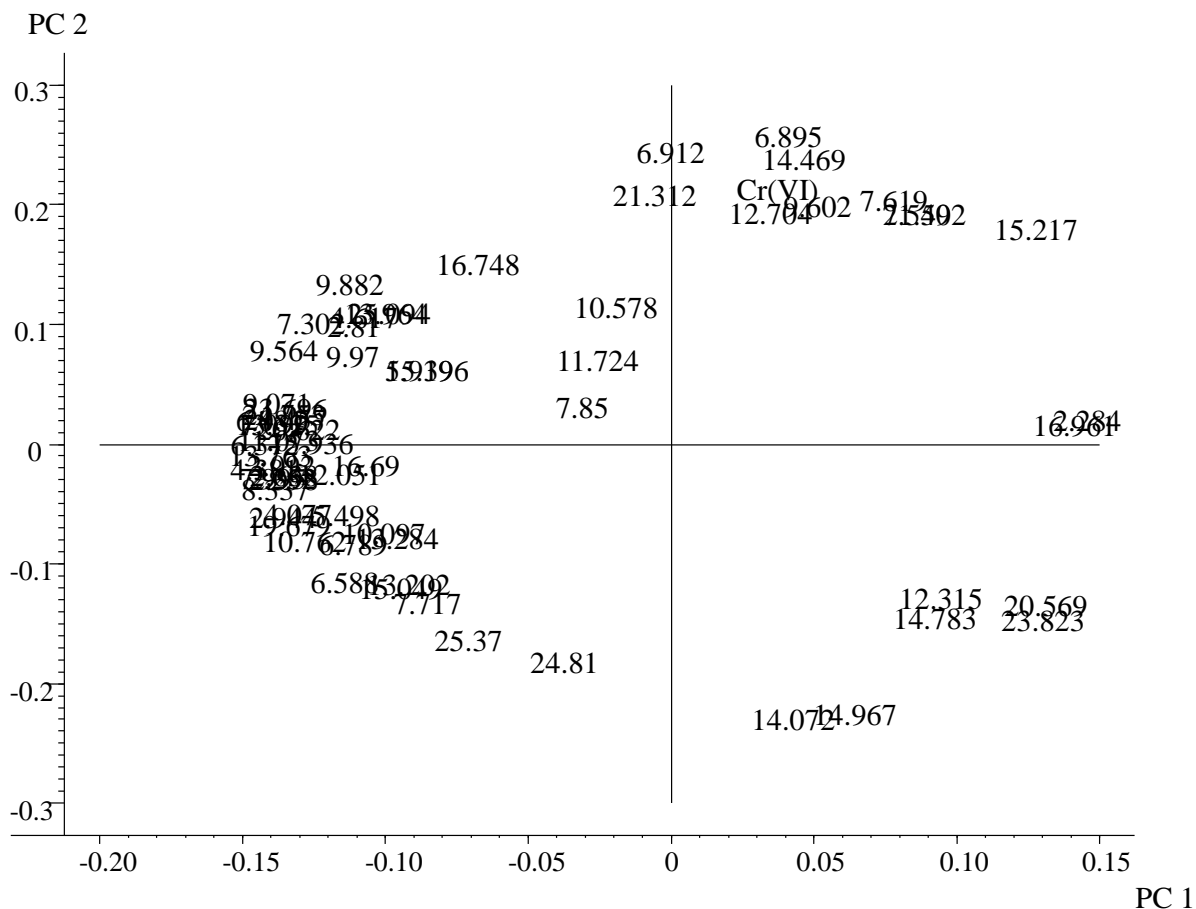


Figura 13. Grafica de las variables medidas en extractos de raíces y partes aéreas de girasol (x-loadings plot) para los componentes principales 1 y 2.

En Figura 13 se presenta la distribución de variables (condiciones de exposición a Cr(VI), y áreas de picos cromatográficos caracterizados por su tiempo de retención) en las coordenadas de PC1 y PC2 (X-loadings plot). Esta grafica permite detectar variables importantes del sistema; en este caso las variables que están cerca entre sí, tienen una alta y positiva correlación si los dos primeros PCs explican un alto porcentaje de la varianza de datos (70 – 75%): Las variables que están en cuadrantes opuestos diagonalmente tienen una correlación negativa. En este caso solo nos concentraremos en aquellos que tienen una correlación positiva con la concentración de Cr(VI) a la que fueron expuestas las plantas.

Las variables cercanas al Cr(VI) corresponden a los compuestos que se eluyen de la columna con tiempos de retención 6.91, 14.47, 12.70 y 9.60 min (Fig. 13).

Finalmente, en la Fig. 14 se presentan las varianzas residuales de cada una de las muestras, mostrando una distribución relativamente uniforme y por ello, ausencia de posibles “outliers”. La Fig. 15 corresponde a los resultados de validación cruzada del modelo PCA, donde se observa que sacando una muestra a la vez para construir este mismo modelo PCA, para los dos primeros PCs se pierde aprox 42% de variabilidad descrita por el modelo de validación respecto al modelo de calibración. Este resultado indica que los resultados PCA obtenidos en esta parte de trabajo tienen carácter nada más indicativo, pero no estadísticamente significativo. Cabe mencionar que en cromatografía de gases, el uso del estándar interno es sumamente importante, debido a posibles errores en la inyección de muestra y/o eficacia en la etapa de detección. El análisis de extractos de plantas realizado en este trabajo se llevó a cabo sin adición de estándar interno, lo que debería corregirse en un trabajo futuro.

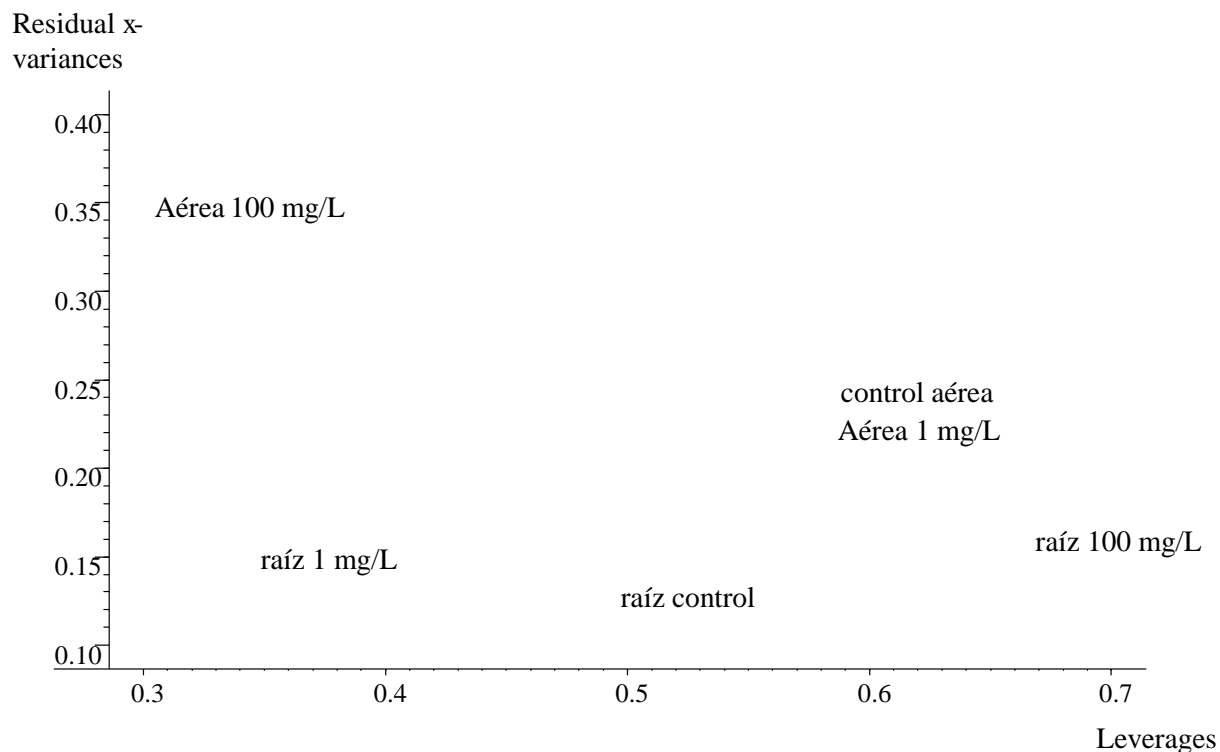


Figura 14. Grafica de la varianzas residuales para las muestras incluidas en la construcción del modelo PCA.

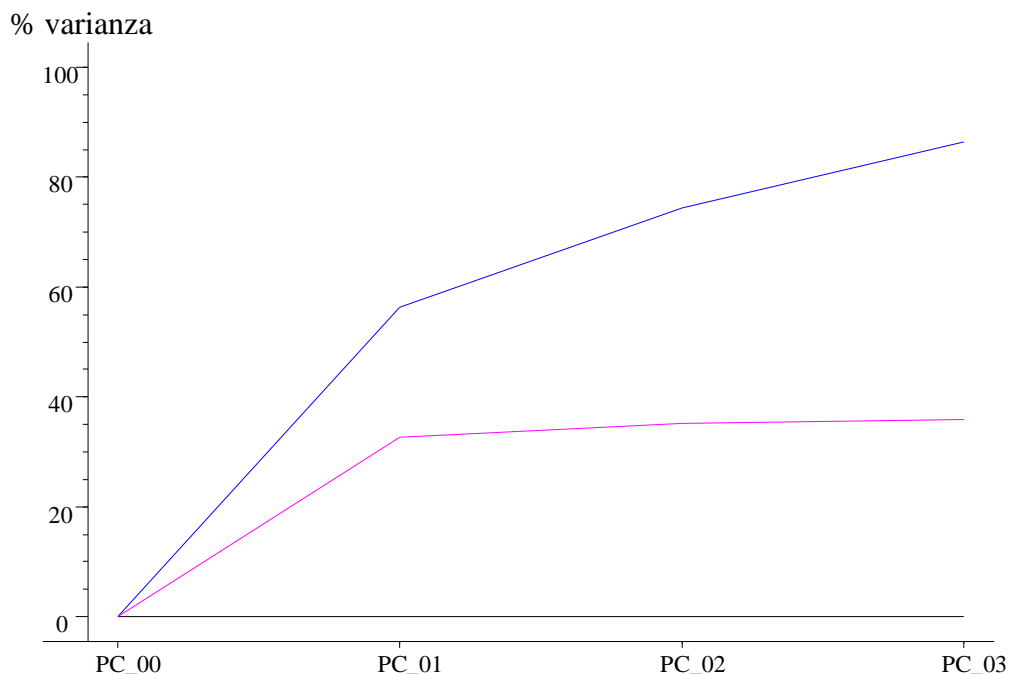


Figura 15. Porcentaje de variabilidad del sistema (varianza) descrita por tres PCs en la etapa de calibración (línea azul) y en la etapa de validación cruzada (línea roja).

Una vez detectados los compuestos con tiempos de retención 6.91, 14.47, 12.70 y 9.60 min, como asociados con la exposición de la planta a Cr(VI), en una segunda etapa se analizaron muestras preparadas de la misma manera que se hizo para GC-FID y se inyectaron en un cromatografo de gases modelo 7890 acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo, modelo 5975c de Agilent Technologies. Las condiciones del análisis cromatográfico y detección se resumen en Tabla 6.

Tabla 6. Las condiciones instrumentales del GC-MS utilizadas en el análisis de extractos de *L. sativum* y *H. annuus*.

CG-MS Agilent 7890/5975c	
Columna	ZB-5, longitud 30 m, 0.25 μ m de grosor de película
Gas de acarreo	Helio Flujo:0.8 mL/min
Inyección	split 1:10 volumen: 1 μ L
Temp. Inyector	240 °C
Programa del horno	Temp. Inicial 70°C, 1 min. 10°C/min hasta 300°C, 5 min.
Rango de detección, m/z	60 – 600

De manera de ejemplo, en la Figura 16 se presentan cromatogramas de iones totales (TIC, intervalo de m/z 60 – 600) obtenidos en el análisis de extractos de raíces de girasol. Comparando el perfil de elución de los compuestos registrados con dos tipos de detección (Fig.16), se observan importantes diferencias, esto debido a que en la detección MS no se tomaron en cuenta compuestos de baja masa molecular ($m/z > 60$), debido a ligeramente diferentes condiciones y tiempos de corrida cromatográfica y diferente sensibilidad de los dos detectores. Por otra parte, en estos cromatogramas se pueden apreciar similares agrupaciones de picos en la región 13-17 min y 22-23 min, mismos donde aparecen diferencias en intensidades dependiendo de la concentración de Cr(VI) en el medio.

H. annuus

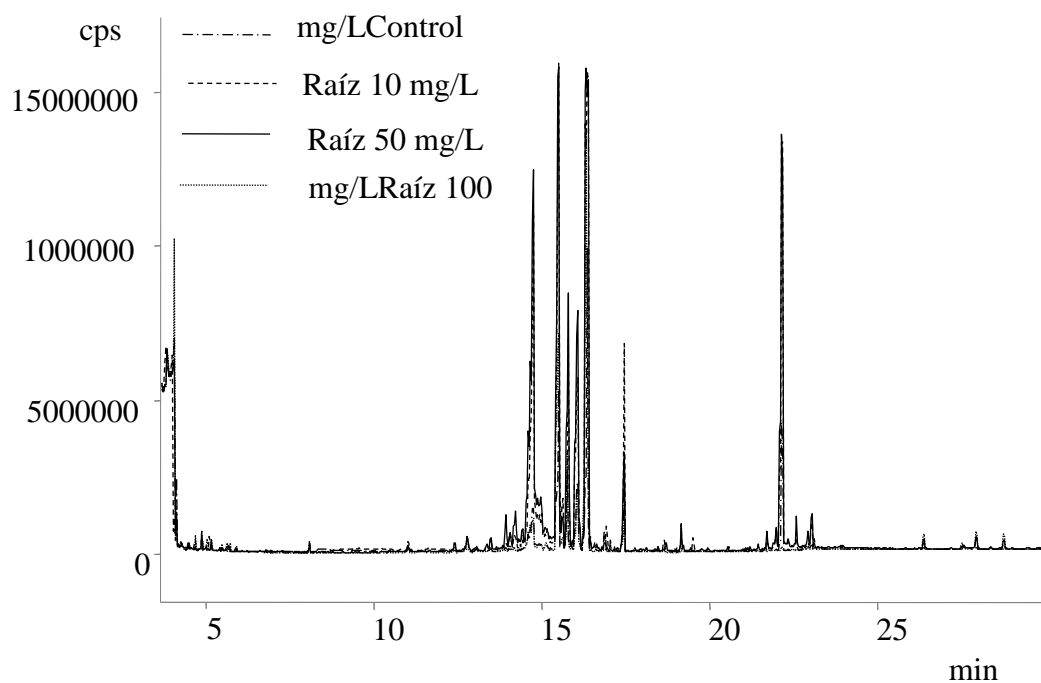


Figura 16. Cromatogramas GC-MS (TIC, m/z 60-600) obtenidos en el análisis de extractos de raíces de girasol; se presenta la región de elución donde se detectaron mayores diferencias entre intensidades de las señales, dependiendo de la concentración de Cr(VI) en medio de cultivo.

Se intentó identificar los compuestos con base en los índices de retención y espectros de masas.

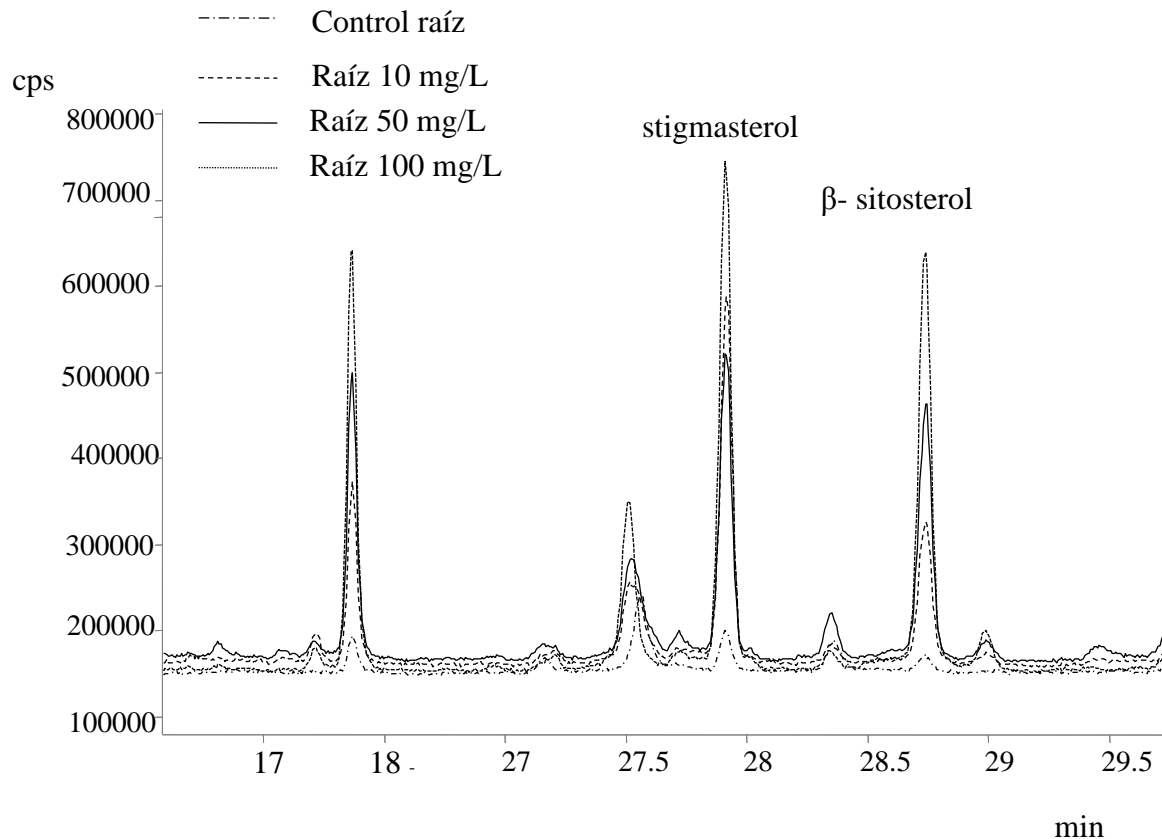


Fig. 17. Cromatograma GC-MS de muestras de raíces de *H. annuus* expuestas a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI).

En la Fig. 17 se presentan los mismos cromatogramas que en Fig. 16, pero solamente en la región de elución de los dos compuestos identificados; se ve un aumento de la intensidad de la señal de β -sitosterol y stigmasterol conforme aumenta la concentración de Cr(VI) en el medio de cultivo. El β -sitosterol es un fitoesterol distribuido ampliamente en el reino de las plantas y es conocido por estar involucrado en la estabilización de la membrana, de la misma manera el stigmasterol tiene propiedades muy similares y está muy relacionado con el β -sitosterol[81], por lo que la identificación de estos compuestos en plantas expuestas a estrés impuesto por Cr(VI) parece tener una relevancia biológica.

Los cromatogramas obtenidos en el análisis de las partes aéreas de *H. annuus* se presentan en la Figura 18.

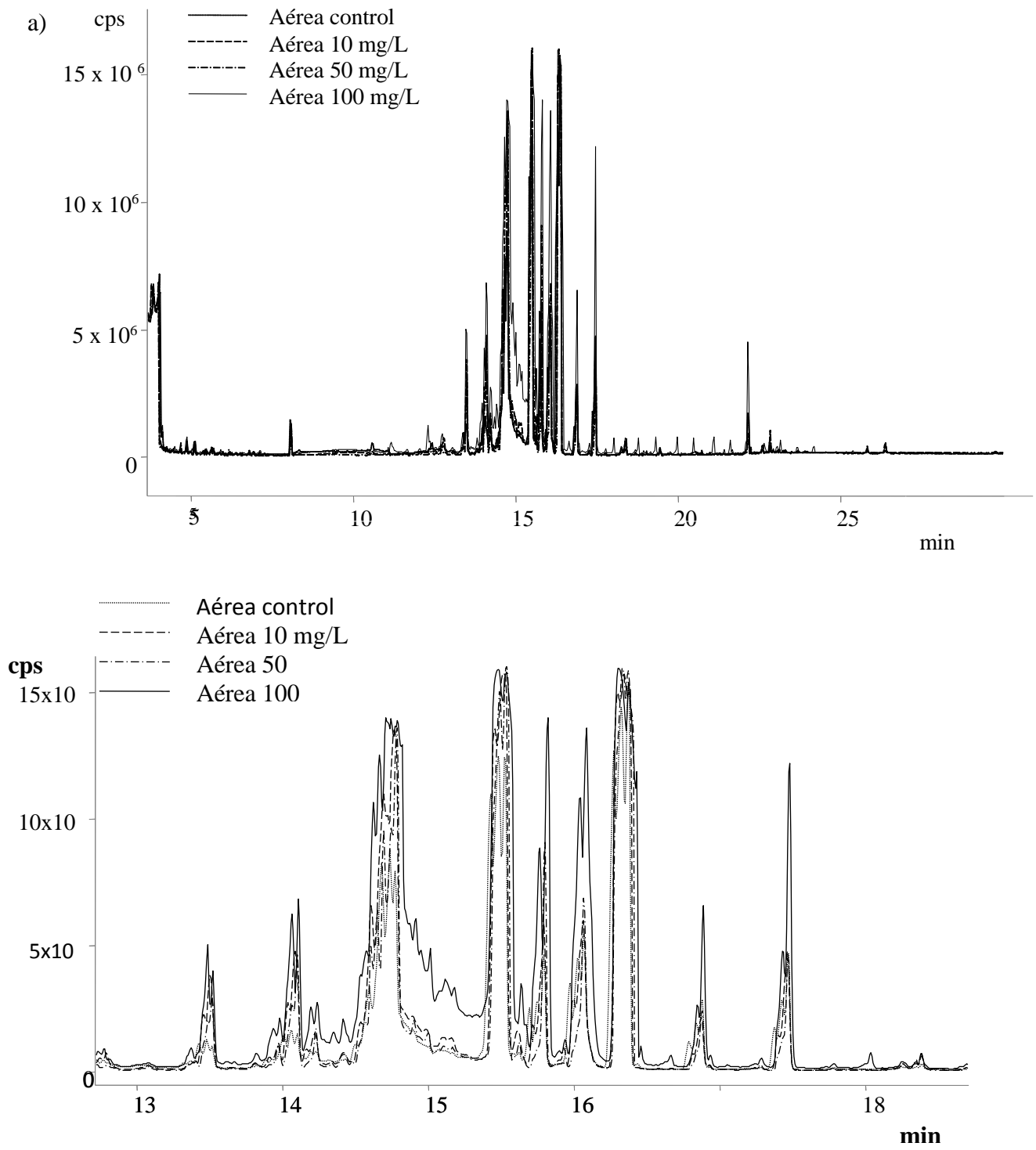


Figura 18. Cromatogramas GC-MS (TIC, m/z 60 – 600) obtenidos en el análisis de la parte aérea de *H. annuus* expuestas a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de Cr(VI) derivatizadas con BSTFA. A) Cromatograma completo. B) Acercamiento de la región de elución 13 –18 min.

De manera similar que en el análisis de los raíces, en estos cromatogramas también se observan cambios en la intensidad de varias señales; en particular en la región de elución 13 – 18 min (Fig. 18b) existe la tendencia de un incremento de la concentración de los metabolitos conforme se aumentó la concentración de Cr(VI) en el medio. Los tiempos de retención y la complejidad de esta región de cromatograma apuntan, con base en la información bibliográfica, que los compuestos eluidos corresponden a carbohidratos [82]. Como ya hemos mencionado, la exposición de plantas a metales pesados estimula la producción de ROS, el cual puede causar daño a macromoléculas e interferir con la respiración celular y el metabolismo de carbohidratos[83], por lo que cambios de la intensidad de las señales en la región de elución de azúcares es interesante y este aspecto debe ser estudiado más a fondo en un trabajo futuro.

En el caso de *L.sativum* , se llevó a cabo el análisis del medio de cultivo en el que creció la planta; para ello se tomaron 200 μ L del medio por duplicado y se llevaron hasta sequedad al vacío (Speedvac), después se agregó 300 μ L de piridina y 50 μ L de BSTFA, y se incubaron durante 30 minutos a 60 °C, para su introducción al sistema GC-MS bajo las mismas condiciones instrumentales (Tabla 6). En la Figura 19 se muestran cromatogramas totales, obtenidos para medios con diferentes concentraciones de Cr(VI). Analizando los datos obtenidos, se logró identificar el fitoesterol β -sitoesterol (tiempo de retención 21.60 min), aunque no se encontró diferencias entre las intensidades de sus señales en medios con diferente concentración de Cr(VI).

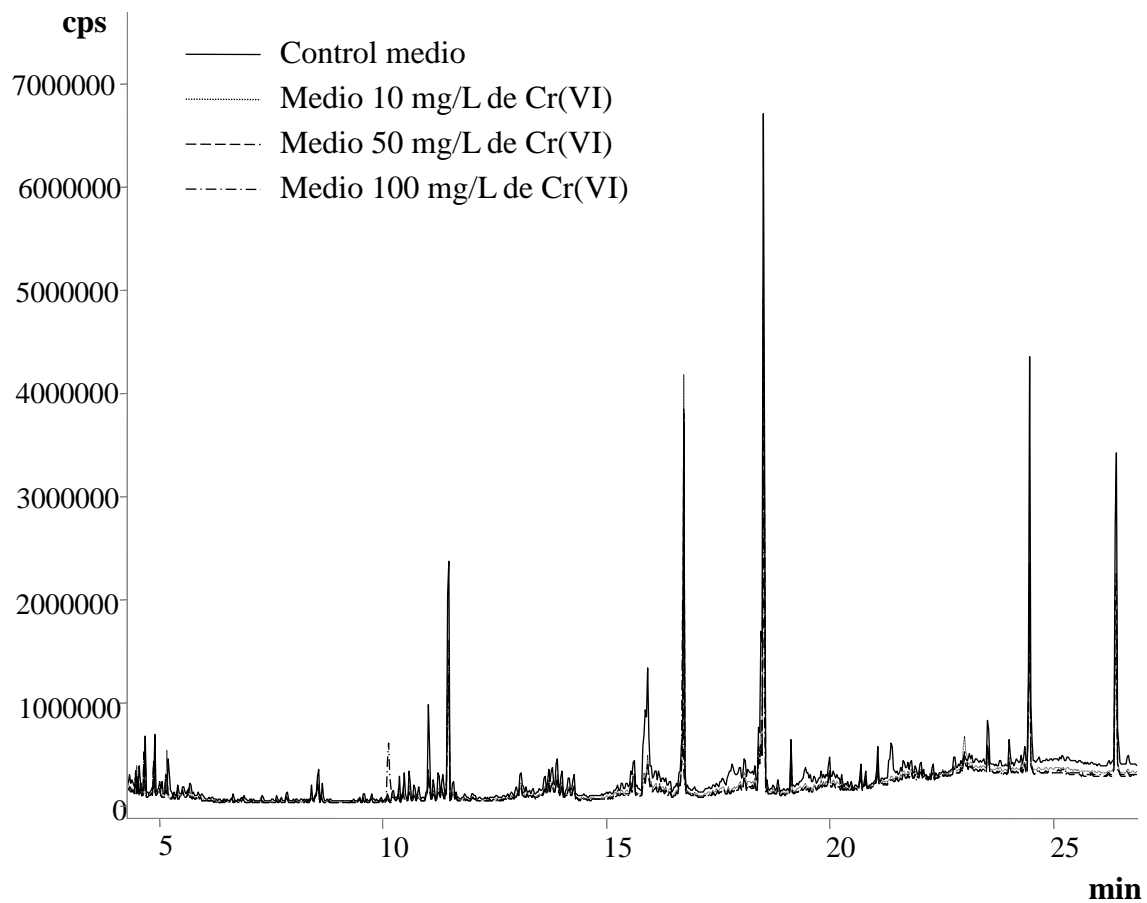


Figura 19. Cromatogramas GC-MS, previa derivatización con BSTFA (TIC, m/z 60 – 600), obtenidos en el análisis de medios Hoagland donde crecieron las plántulas de *L. sativum* bajo exposición a tres diferentes concentraciones de Cr(VI).

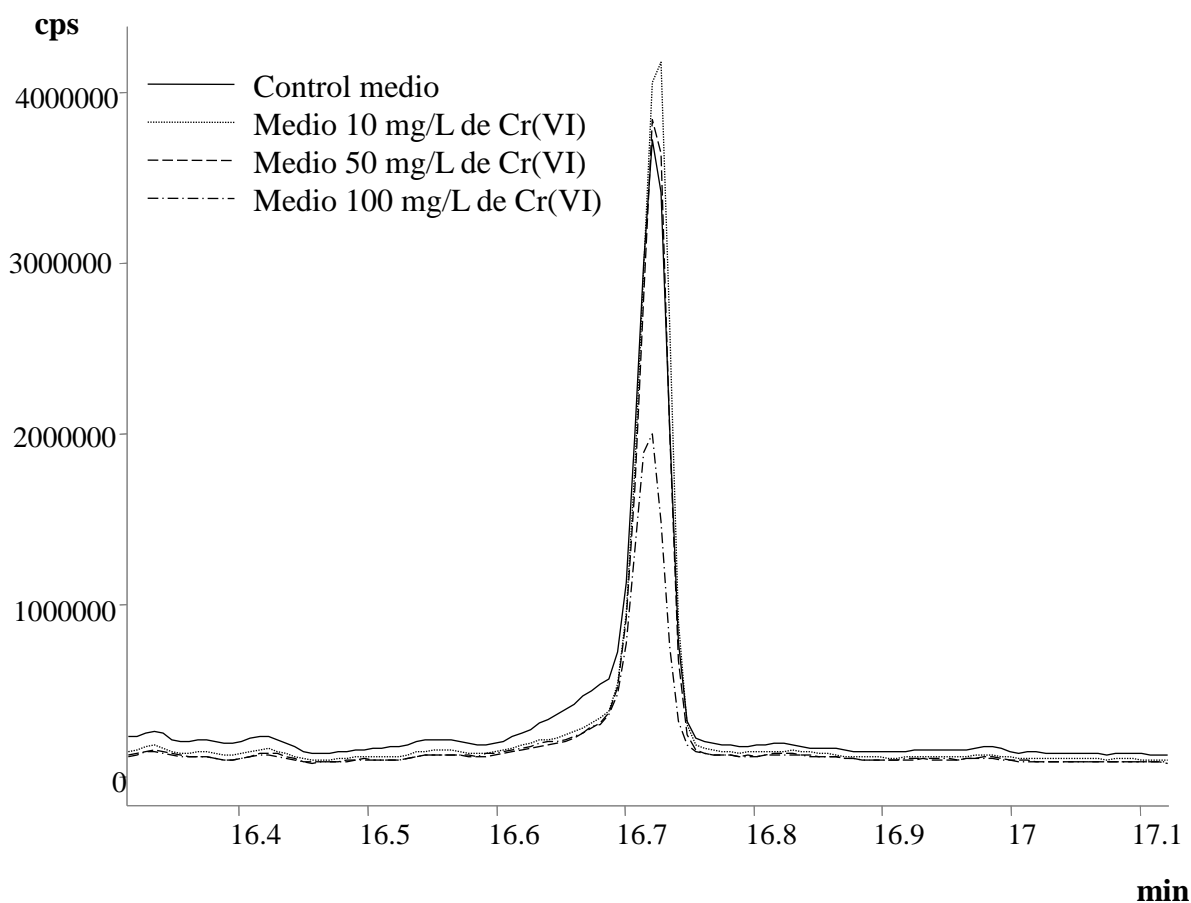


Figura. 20. Acercamiento de los cromatogramas GC-MS del medio Hoagland en donde crecieron las plántulas de *L. sativum* a diferentes concentraciones del Cr(VI). El compuesto presente es el ácido palmítico.

Otro compuesto identificado fue el ácido palmítico (tiempo de retención 16.73 min); como se observa en la Figura 20, la intensidad de su señal presentó una disminución conforme aumentaba la concentración de Cr(VI) en el medio donde crecieron los berros. Este mismo comportamiento se observó para el pico con tiempo de retención 18.51 min, correspondiente al ácido octanoico. Aparentes cambios en las concentraciones de ácidos grasos pueden tener relevancia en el contexto del estrés oxidativo causado por el Cr(VI) como ión estresante.

Aunque los resultados obtenidos en esta primera parte de trabajo tienen un carácter muy preliminar, confirman que la plataforma que engloba las herramientas analíticas GC-FID, GC-MS y PCA es adecuada para estudiar respuesta de las plantas al estrés abiótico impuesto por Cr(VI).

Se propone seguir con este tema en un trabajo futuro para lograr los resultados analíticos validados y las conclusiones contundentes. Por otro lado, se decidió utilizar la misma plataforma, complementando las técnicas antes mencionadas con el ensayo espectrofotométrico y el análisis de especiación de cromo para estudiar participación de metabolitos de una cepa bacteriana en el proceso de reducción de Cr(VI).

4.2. Estudio analítico de la reducción de Cr(VI) en cultivos de *B. cereus* en presencia del ión Mn(II).

Hay mucha información acerca de bacterias capaces de reducir el Cr(VI), la mayoría de estas bacterias son aisladas de lugares contaminados con Cr y muestran cierta tolerancia a este elemento. En cuanto a los mecanismos de la reducción de Cr(VI), a menudo estudiados en estos organismos, se han estudiado desde el pH, participación de donadores de electrones (azúcares como glucosa, sucrosa, fructosa, lactosa, aminoácidos, ácidos carboxílicos, etc.), cantidad de células, tipo y actividad de enzimas, temperatura a la cual crecen las bacterias hasta la agitación en las condiciones de crecimiento en laboratorio llegando a la conclusión de que todas estas variables pueden tener influencia en la reducción de Cr(VI)[84-86]. En particular, ya fue mencionado en la introducción que pequeños ácidos carboxílicos pueden actuar como donadores de electrones durante la reducción del Cr(VI); dichas reacciones fueron estudiadas en sistemas modelo abióticos, en los suelos y, solamente unos pocos estudios consideraron este mecanismo de reducción no-enzimática en cultivos microbiológicos [54]. Por lo general, la reducción con participación de ácidos orgánicos requiere de las condiciones relativamente ácidas (pH 2.5-5) que no siempre son compatibles en las requeridas para un buen crecimiento de bacterias. Algunos autores han estudiado acción catalítica de ión Mn(II) durante la reducción de Cr(VI) por los ácidos cítrico, ascórbico y ácidos tartárico tanto en soluciones modelo como en los suelos a valores de $\text{pH} < 5$ [49, 58-62]. En este contexto, la idea original del presente proyecto ha sido examinar posible efecto de Mn(II) en la reducción de Cr(VI) en cultivos de *B. cereus*, esperando que los reductores no-enzimáticos podrían ser algunos ácidos carboxílicos de baja masa molecular, producidos como productos del metabolismo de la bacteria y que dicho proceso de reducción puede ocurrir en las condiciones de pH neutro, esencial para el buen crecimiento de la bacteria. Con base en la revisión bibliográfica, se ha considerado que el ácido oxálico podría ser

un reductor de Cr(VI) en presencia de Mn(II) como facilitador y a pH natural del cultivo de bacterias [78].

4.2.1. Crecimiento de la bacteria *B. cereus*.

En la primera etapa del trabajo se evaluó el crecimiento de *B. cereus* en medio de cultivo control, en presencia de Cr(VI) 30 mg/L, 50 mg/L, Mn(II) 11.8 mg/L, 5.9 mg/L, 2.9 mg/L y en presencia de la mezcla de ambos. Para ello, se trabajó con volúmenes de medio con bacteria de 2 mL y se utilizaron los volúmenes y el procedimiento de preparación de estos como muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Las concentraciones de Mn(II) y Cr(VI) utilizados para la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de *B. cereus*.

Muestra	Concentración final, mg/L		Volúmenes de cada uno de los componentes de la solución, μL					Total
	Mn(II)	Cr(VI)	inoculo	Mn(II)*	Cr(VI)**	Agua	Medio mínimo	
Control	0	0	100	0	0	150	1750	2000
1	0	30	100	0	60	90	1750	2000
2	0	50	100	0	100	50	1750	2000
3	11.8	0	100	20	0	130	1750	2000

*Solución de 1180 mg/L de Mn(II) a partir de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

** Solución de 1000 mg/L de Cr(VI) a partir de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Para evaluar el crecimiento bacteriano se midió la densidad óptica (600 nm) a diferentes tiempo por 24 horas de los cultivos descritos en la Tabla 6. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 21; se observa que ni Mn(II) a una concentración de 12 mg/L ni Cr(VI) con 30 mg/L tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria. En presencia de Cr(VI) 50 mg/L, se observó inhibición del crecimiento, por lo que se decidió utilizar en los experimentos futuros la concentración de Cr(VI) 30 mg/L.

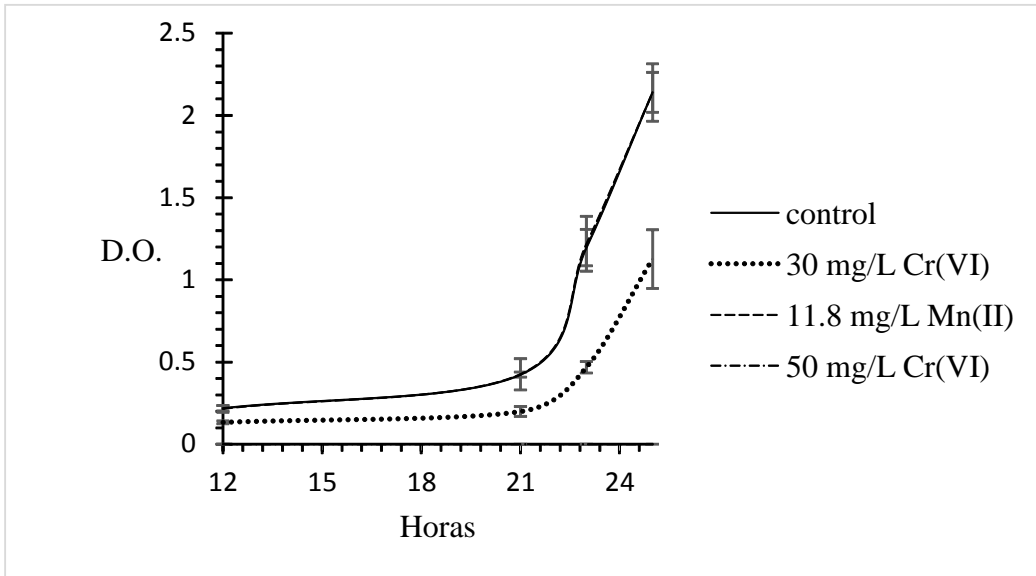


Figura 21. Crecimiento de *B. cereus*, en medio mínimo control, en medio con 30 mg/L de Cr(VI), 50 mg/L de Cr(VI) y 11.8 mg/L de Mn(II).

A continuación, se examinó el pH de cultivos a diferentes tiempos de crecimiento, sin observar cambios significativos durante los 24 h del experimento e independiente de la composición del medio (sin o con Cr(VI), Mn(II)). De manera de ejemplo, en la Figura 22 se presentan los valores obtenidos para el cultivo control.

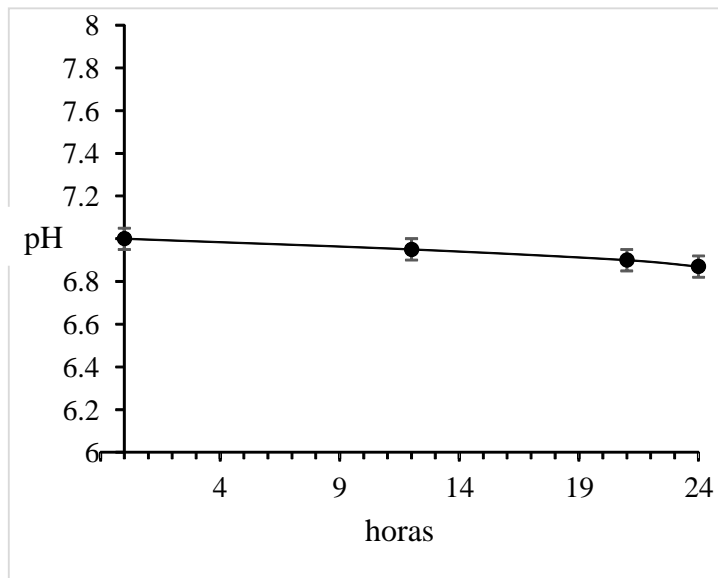


Figura 22. Registro del pH del cultivo control durante 24 h del crecimiento.

4.2.2. Ensayos de reducción de Cr(VI) en cultivos de *B. cereus*

Con el fin de evaluar la capacidad de la bacteria para reducir el Cr(VI) y observar posible efecto de Mn(II) en dicha reducción, se prepararon los medios de cultivo que, a diferencia del medio control contenían Cr(VI), Mn(II) o mezcla de los dos iones en concentraciones que se presentan en la Tabla 7. Después de preparar los tubos tal como se describe en la sección 3.4.a, se tomaron alícuotas de 200 μL del medio a los 3.5, 6.5 y 24 h, se centrifugaron y tomaron 100 μL para la determinación de Cr(VI) por el método espectrofotométrico con difenilcarbazida (DPC). Este método se basa en un proceso óxido-reducción donde el cromo hexavalente Cr(VI) reacciona con la 1,5 difenilcarbazida en medio ácido formando Cr(III)-difenilcarbazona de color violeta que presenta banda de absorción con el máximo en 540 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante la calibración externa utilizando las soluciones de 0, 2.5, 5, 15, 30, 60 mg/L de Cr(VI). El procedimiento analítico consistió en agregar a la alícuota de 100 μL de la solución estándar o del medio de cultivo, 100 μL de ácido sulfúrico 0.2 M, 500 μL de agua y 200 μL de una solución de DPC de 0.7 mg/L. Una vez formado el complejo, se midió absorbancia en 540 nm. La ecuación de regresión lineal se obtuvo mediante el método de mínimos cuadrados ($A = 0.0152c + 0.0016$, $R^2 = 0.999$). Se evaluó el límite de detección con base en tres desviaciones estándar para 10 lecturas del blanco siendo de 0.07 mg/L. Los resultados de la determinación de Cr(VI) en medios de cultivo se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de determinación de Cr(VI) residual en medio de cultivo a diferentes horas de contacto con concentraciones de Cr(VI) a 50 mg/L y 35 mg/L obtenidos por el método de difenilcarbazida.

Concentración de Cr(VI) y Mn(II) en cultivo, mg/L		Concentración residual de Cr(VI) y DE, mg/L					
		3.5 h		6.5 h		24 h	
Mn(II)	Cr(VI)	Cr(VI)	DE	Cr(VI)	DE	Cr(VI)	DE
0	0	nd	-	nd	-	nd	-
0	35	29.8	2.6	28.7	0.4	23.8	4.5
2.9	35	29.0	0.5	25.9	2.3	10.0	1.9
5.9	35	28.5	4.7	21.1	2.2	2.11	0.2
11.8	35	24.1	2.4	17.8	1.9	0.26	0.0
11.8	50	42.0	3.0	37.2	1.6	1.54	0.3
0	50	50.7	0.6	53.3	2.3	58.1	0.8

En la primera muestra observamos que en el blanco, que solo es medio de cultivo con el inculo de bacterias, no tenemos contaminación con Cr(VI), la segunda muestra contiene el medio con el inculo de bacterias más 35 mg/L de Cr(VI) donde podemos observar que el medio con bacterias sin Mn(II) reduce muy lentamente el Cr(VI) de tal manera que después de 24 h queda aún un 68% del Cr(VI) inicial. Cuando al medio se agrega Mn(II) es evidente que aumenta la velocidad de reducción y este efecto es directamente proporcional a la concentración del ión Mn(II) añadido, en este caso podemos observar que para dos concentraciones de Mn(II) (5.9 y 11.8 mg/L) la reducción de Cr(VI) es prácticamente completa después de 24 h. En la figura 23 se observa gráficamente este comportamiento.

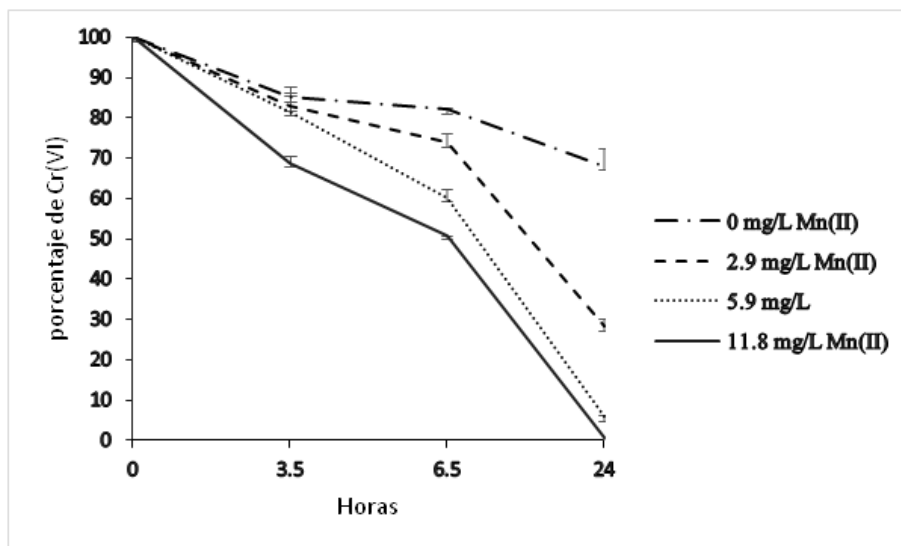


Figura 23. Porcentaje de Cr(VI) residual en el medio de cultivo a diferentes tiempos de crecimiento, dependiendo de la concentración de Mn(II).

Resumiendo, con los resultados obtenidos hasta este momento, se ha demostrado que el crecimiento de *B. cereus* no es inhibido en presencia de hasta 30 mg/L Cr(VI) y que el ión Mn(II) hasta 11.8 mg/L no afecta dicho crecimiento. Independientemente de las condiciones de exposición de la bacteria empleadas en este estudio, el pH del cultivo se mantiene prácticamente constante durante 24 h. En estas condiciones (pH 7), el cultivo presenta capacidad de la reducción de Cr(VI), pero con una cinética relativamente lenta (68 % de reducción durante 24 h). La presencia de ión Mn(II) en el cultivo permite acelerar la reducción de Cr(VI) en el sistema estudiado, obteniéndose prácticamente 100% de la reducción durante 24 h para 5.9 mg/L y 11.8 mg/L de Mn(II) agregado al medio.

Con base en los estudios de otros autores, nuestros resultados sugieren que el Mn(II) actúa como facilitador de la reducción de Cr(VI) y que el donador de electrones en dicho proceso podría ser el ácido oxálico [57, 87-89]. En la introducción ya fue mencionado que los ácidos carboxílicos tales como cítrico, oxálico tartárico o málico pueden participar como reductores del Cr(VI) en presencia de Mn(II) o Fe(II); sin embargo en los trabajos reportados anteriormente, fue necesario utilizar condiciones de pH relativamente bajo (pH < 5) [49, 57-62, 87, 90, 91]. Hay que resaltar que *B. cereus* crece en pH neutro y aun así se observó la reducción de Cr(VI), misma que fue

acelerada en presencia de Mn(II). Adicionalmente en el laboratorio, se llevaron a cabo los ensayos de reducción de Cr(VI) en soluciones acuosas del ácido málico, cítrico, tartárico y oxálico a diferentes valores del pH (2.5 – 7.0), sin y con adición de Mn(II), respectivamente. En estos experimentos, la reducción de Cr(VI) a pH 7 ocurrió únicamente en la solución del ácido oxálico (ácido en forma disociada $pK_{a1} = 1.27$, $pK_{a2} = 4.28$) y además, la adición de Mn(II) favoreció la cinética de la reacción (estos experimentos fueron realizados en otro trabajo de tesis). Con base en estas consideraciones, el estudio se centró en examinar si el ácido oxálico podría ser el metabolito de la bacteria, y al menos en parte responsable por la reducción de Cr(VI).

4.2.3. Ensayos de reducción de cromo y evaluación de perfil de metabolitos en el medio de cultivo gastado

-Determinación de Cr(VI) por ensayo con difenilcarbazida

Para observar mejor el gasto de un posible donador de electrones durante el proceso de reducción de Cr(VI), se decidió utilizar el medio gastado (sin presencia de la bacteria, tal como se describe en la sección 3.4.b. En breve, después de que el crecimiento bacteriano llegó a una densidad óptica 0.5 (600 nm), se eliminaron los microorganismos mediante filtración (disco de 0.45 μm) obteniendo la solución que contenía los componentes del medio de crecimiento y los productos del metabolismo de la bacteria. A esta solución se agregó Cr(VI) y diferentes concentraciones de Mn(II). Para esto se utilizaron 1.750 mL de medio gastado para cada muestra por triplicado y se le agregaron 60 μL de una solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ con una concentración de 1000 mg/L. Una vez preparados los medios gastados (concentración final de Cr(VI) 30 mg/L) se añadieron los volúmenes de una solución de 1180 mg/L de Mn(II) a partir de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para obtener su concentración final 2.9 mg/L o 11.8 mg/L y finalmente se añadió agua para completar los 2 mL finales para cada muestra. Después de 3 h de contacto, se determinó la concentración de Cr(VI) en cada una de las soluciones por el método de difenilcarbazida; los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9. (Promedio y DE con base en tres réplicas independientes).

Tabla 9. Resultados de determinación de Cr(VI) residual por método de difenilcarbazida en medio gastado después de 3 horas de contacto, en presencia de distintas concentraciones de Mn(II)

Muestra	Promedio, mg/L	DE
Medio gastado control	nd	-
medio gastado + 30 mg/L Cr(VI)	30.3	0.5
Medio gastado + 30 mg/L Cr(VI) + 2.9 mg/L Mn(II)	24.3	2.8
medio gastado+ 30 mg/L Cr(VI) + 11.8 mg/L Mn(II)	18.2	0.2

El objetivo de los ensayos en medio gastado fue examinar si la reducción de Cr(VI) en el medio ocurre gracias a la presencia de los metabolitos extracelulares del microorganismo. Como se puede observar en la tabla 9, no tenemos contaminación por Cr(VI) en nuestro medio inicialmente; en las muestras que contienen Cr(VI) 30 mg/L y no contienen Mn(II), a las 3 horas presentó un 100% de Cr(VI) en la solución; en cambio, en las muestras que contienen Mn(II) se observó una disminución de Cr(VI) que depende claramente de la concentración de Mn(II) agregado al medio de tal manera que en presencia de 11.8 mg/L Mn(II), aprox. 40% del Cr(VI) quedó reducido después de tres horas de contacto. Estos resultados confirman la participación de Mn(II) en la reducción de Cr(VI) por metabolitos extracelulares de *B. cereus*.

- Análisis de metabolitos en medio gastado por GC-FID

Una vez demostrado que los compuestos formados durante el crecimiento de *B. cereus* y presentes en el espacio extracelular tienen la capacidad de reducir el Cr(VI) y que el Mn(II) favorece dicha reducción a pH 7, se procedió con el análisis del medio de cultivo gastado con un enfoque en los metabolitos de bacteria y especialmente en el ácido oxálico.

Se utilizó el mismo procedimiento de derivatización y análisis por GC-FID que había sido descrito en primera parte de trabajo (análisis de extractos de plantas). En breve, se tomaron 300 μ L de la muestra (medio gastado) y se secó al vacío, enseguida se agregaron 50 μ L de BSTFA y 300 μ L de piridina y se incubaron a 60 °C durante 30 min. Las condiciones del análisis cromatográfico se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones instrumentales del análisis GC-FID llevado a cabo en los medios gastados.

CG FID Perkin Elmer, Clarus 500		
Columna	ZB-5, longitud 30 m, 0.25 μ m de grosor de película	
		Flujo: 1.6
Fase Móvil	Hidrogeno	mL/min
Inyección	split 1:10	volumen: 1 μ L
Temp. Inyector	240 °C	
Programa del horno	Temp. Inicial 70°C, 1 min. 10°C/min hasta 300°C, 3 min.	
Temp. Detector	320°C	
	Aire: 450	
Flujos	mL/min	H ₂ : 45 mL/min

Para realizar el estudio comparativo de la cantidad de los metabolitos (derivatizados con BSTFA) en diferentes muestras, se utilizó como estándar interno el pico correspondiente a fosfatos que fue previamente identificado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas utilizando la biblioteca NIST 11 con el programa NIST MS Search 2.0 y el análisis de datos fue hecho con el programa AMDIS versión 2.7 (Fig. 24). Se escogió este compuesto ya que los fosfatos están presentes en el medio de cultivo, pero no participan en la reducción de Cr(VI); por lo tanto, su concentración no cambia durante el proceso de reducción y solamente será afectada por errores/imprecisiones cometidos durante el procedimiento, de igual manera que ocurre para otros metabolitos derivatizados con BSTFA.

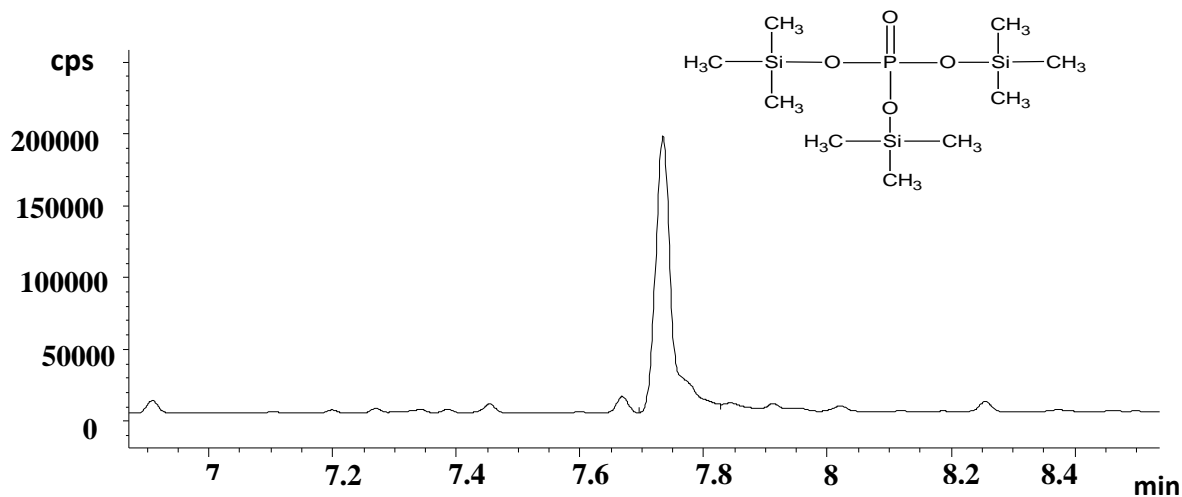


Figura 24. Cromatograma CG-MS, conteo total de iones con un rango de masas de 45 a 600 m/z , del "medio gastado" control en la región donde aparece el fosfato derivatizado con BSTFA.

Una vez establecidas las condiciones del análisis, se obtuvieron cromatogramas de los medios gastados de cultivo, en los cuales se confirmó la presencia del ácido oxálico con tiempo de retención de 5.76 min. La asignación de este pico se obtuvo mediante comparación de su tiempo de elución con el tiempo obtenido en el análisis de estándar de ácido oxálico (Fig. 25).

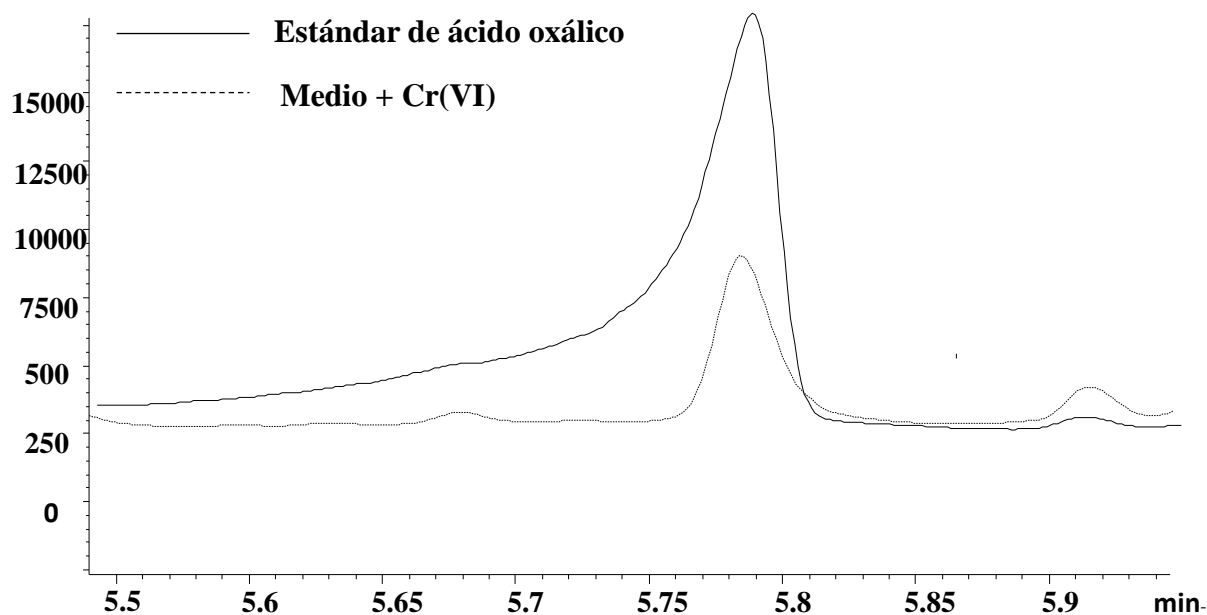


Figura 25. Cromatogramas GC-FID de estándar de ácido oxálico (—) y de medio gastado después de 3h de contacto con 30 mg/L Cr(VI) (---), previa derivatización con BSTFA.

Los resultados obtenidos para el ácido oxálico en diferentes medios gastados se presentan en la Figura 26 y en Tabla 10; en particular para los fines comparativos se calculó la razón de la altura del pico de ácido oxálico sobre la altura del pico de fosfatos como “estándar interno”.

Tabla 10 Cambios del contenido de ácido oxálico en medio gastado con 30 mg/L Cr(VI) en presencia de diferentes concentraciones de Mn(II) (tres réplicas independientes, señal de altura de oxálico normalizado por señal de fosfatos).

Muestra	$A_{\text{oxálico}}/A_{\text{fosfatos}}$	DE
Medio gastado + Cr(VI), 30mg/L	0.0366	0.0005
Medio gastado + Cr(VI), 30 mg/L + Mn(II), 2.9 mg/L	0.0325	0.0004
Medio gastado + Cr(VI), 30 mg/L + Mn(II), 11.8 mg/L	0.0243	0.0015

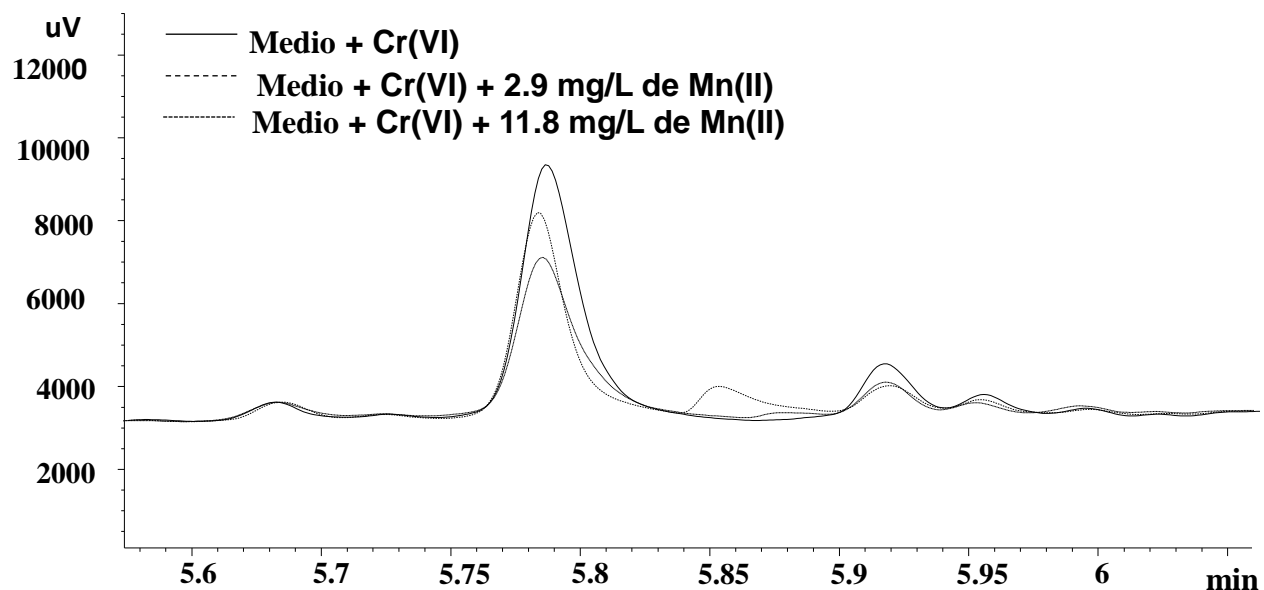


Figura 26. Sección de cromatogramas GC-FID correspondiente a la región de elución del ácido oxálico, comparando tres medios gastados con adición de diferentes concentraciones de Mn(II), después de 3 h de contacto con 30 mg/L Cr(VI).

- Análisis multivariante por el método de componentes principales.

Los resultados presentados en las secciones anteriores son de carácter particular, sin tomar en cuenta el complejo sistema biológico y químico donde ocurre la reducción del Cr (VI). Para obtener un panorama más global sobre participación de los metabolitos de la bacteria en el proceso de reducción del Cr(VI), se procedió hacer un análisis de componentes principales (PCA). Para esto, se utilizaron los datos obtenidos en el análisis GC-FID de medios gastados conteniendo Cr(VI) y diferentes concentraciones de Mn(II), normalizando todos picos cromatográficos por la señal de fosfato trimetilsililado y después de haber alineado los cromatogramas. Una vez realizadas estas operaciones se integraron todos los picos que tuvieran una relación señal ruido (S/N) más alta que 20 y los datos fueron introducidos al programa Unscrambler 7.0, Camo Co. En concreto, para el análisis PCA se tomaron como variables las áreas de los picos cromatográficos (descritos por su tiempo de retención) obtenidas en el análisis por triplicado de todos medios gastados y además, las concentraciones de Mn(II) agregados al medio y las concentraciones residuales de Cr(VI) después de tres horas de contacto con cada uno de los medios (concentración inicial 30 mg/L Cr(VI)) (Tabla 11).

Tabla. 11. Concentraciones de Mn(II) y Cr(VI) que se agregaron al medio gastado para su análisis por GC-FID y concentraciones residuales de Cr(VI) encontradas después de 3 h de contacto (tres réplicas).

Muestra	Concentración residual de Cr(VI) después de 3h de contacto con el medio, mg/L
Medio + Cr(VI)[30mg/L]	30.7 ± 0.5
Medio + Cr(VI)[30 mg/L]+Mn(II)[2.9 mg/L]	24.3 ± 2.8
Medio + Cr(VI)[30 mg/L]+Mn(II)[11.8 mg/L]	18.2 ± 0.2

Los resultados del PCA se muestran en Figuras 27-29. En la Fig. 27 (Scores plot), se muestra la distribución de las muestras en el espacio bidimensional de los dos primeros PCs que describen el 97% de la variabilidad total del sistema. Se observa que en este espacio de reducida dimensionalidad, se obtiene un buen ordenamiento de muestras, desde los medios que no contienen Mn(II) hasta los medios con altas concentraciones de Mn(II).

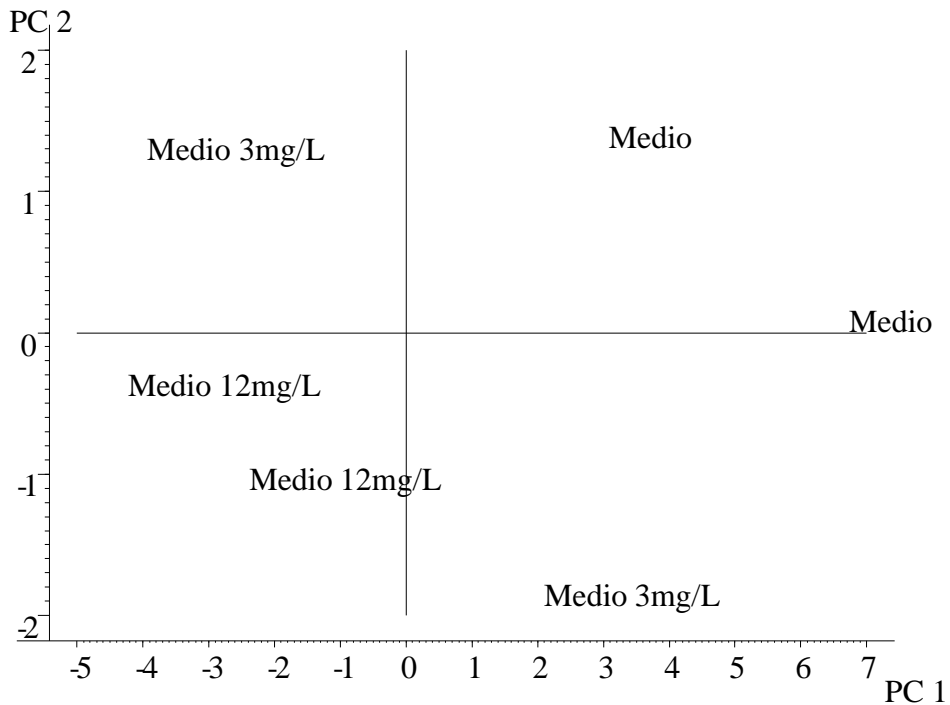


Figura 27. Grafica bidimensional que presenta la distribución de las muestras del medio gastado (scores plot) analizadas por GC-FID y correspondientes a 3 h de exposición a 30 mg/L de Cr(VI) en presencia de 0, 3 y 12 mg/L de Mn(II), en las coordenadas de PC1 y PC2. Las variaciones explicadas por los dos componentes son de 89% y 8% para PC1 y PC2.

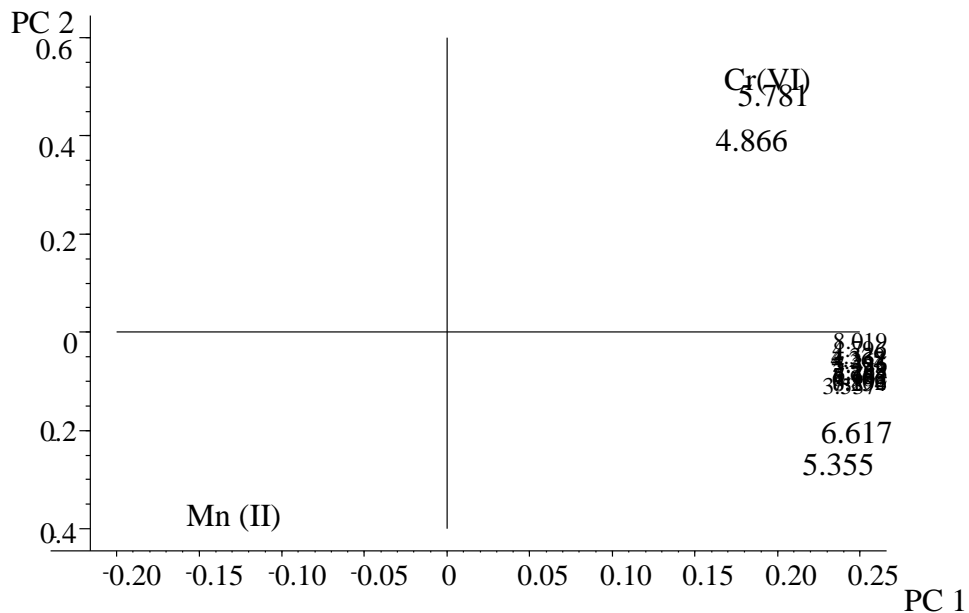


Figura 28. Grafica de las variables medidas en los medios gastados obtenidos a diferentes condiciones de exposición (x-loadings plot) para los componentes principales 1 y 2. (Mn(II)

corresponde a la concentración de Mn(II) agregada al medio; Cr(VI) es la concentración residual de cromo hexavalente después de 3h de contacto: los números corresponden a tiempos de retención de los picos cromatograficos cuyas intensidades se midieron).

Por su parte, en la Figura 28 (X-loadings plot), se presenta la distribución de las variables en el mismo espacio de las dos coordenadas PC1 y PC2; donde se observa claramente la agrupación de la intensidad de los picos cromatográficos (5.78 min y 4.87 min) con Cr(VI), mientras que la variable Mn(II) se asocia inversamente con este grupo de parámetros. Cabe notar que el pico con tiempo de retención 5.78 min fue asignado a la elución del ácido oxálico. Los resultados obtenidos indican que la disminución de la concentración de este ácido en medio gastado (metabolito de la bacteria) está relacionada directamente con la disminución de la concentración de Cr(VI) y que el aumento de la concentración de Mn(II) en el medio influye en la mayor disminución del Cr(VI) y del ácido oxálico. De esta manera se confirma que, entre los metabolitos de la bacteria presentes en el "medio gastado" y derivatizados con BSTFA, el ácido oxálico interviene en el proceso de reducción del Cr(VI) a pH neutro, y que el ion Mn(II) actúa como facilitador de dicho proceso. Cabe mencionar que en solución acuosa a pH 4, Huber y Haight observaron un similar efecto del Mn(II) y postularon la oxidación de ácido oxálico hasta dióxido de carbono en presencia de Cr(VI) [78]. En cuanto al pico cromatográfico con tiempo de retención 4.87 min, en trabajo futuro es necesario su identificación.

Finalmente, en la Figura 29 se presentan las gráficas de la varianza residual y del porcentaje de varianza descrito por los PCs en las etapas de calibración/validación, respectivamente, los resultados obtenidos confirman la significancia estadística del modelo PCA obtenido.

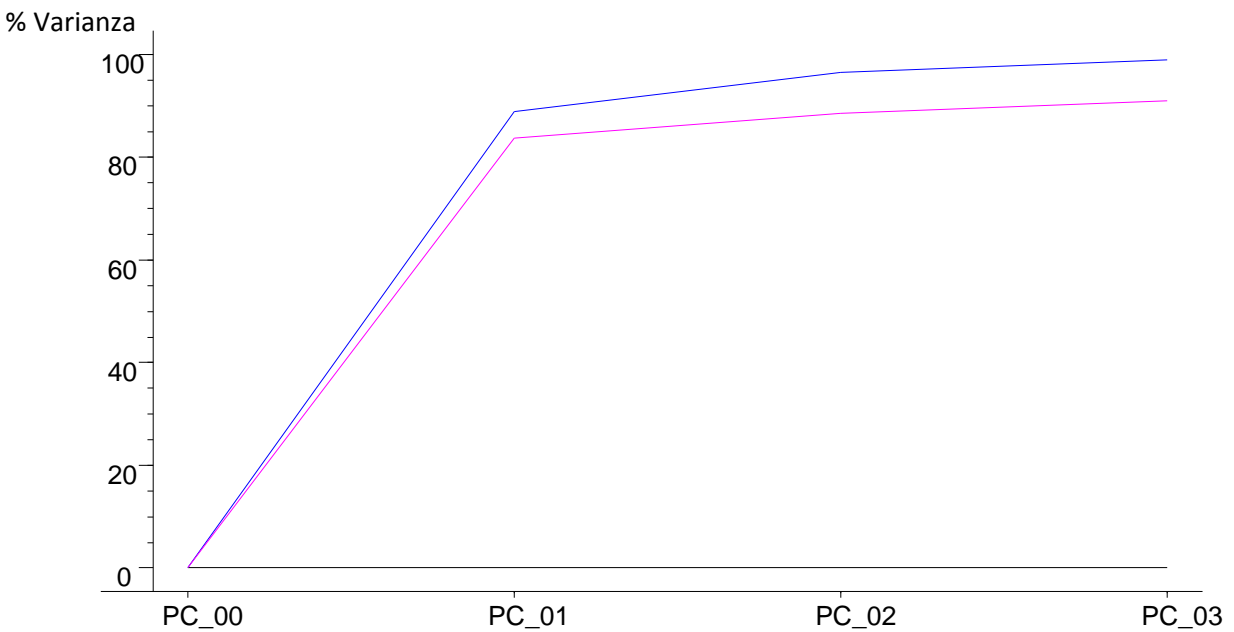
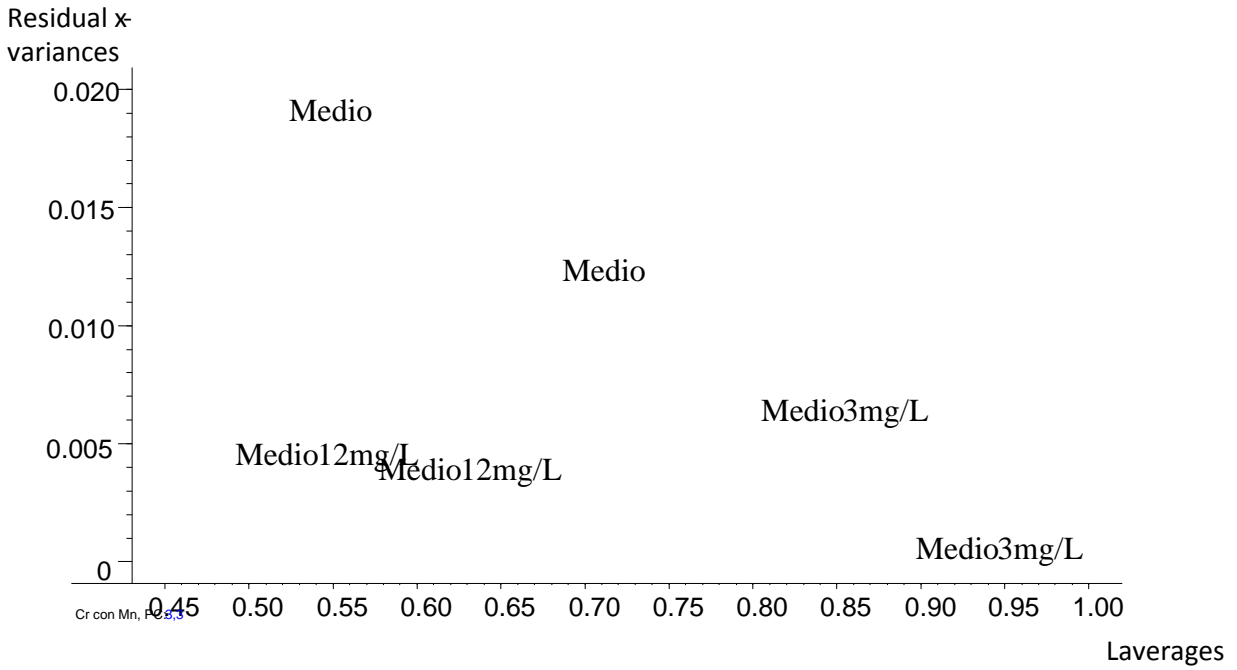


Figura 29. Grafica de la varianzas residuales de las variables de cada muestra (a); resultados de validación cruzada y de calibración del modelo PCA, el porcentaje de la varianza total es calculada como $100 \cdot (\text{varianza inicial} - \text{varianza residual}) / \text{varianza inicial}$. (b);

4.2.4 Especiación de Cr(III)/Cr(VI) por HPLC fase inversa con formación de pares iónicos acoplado a un espectrómetro de emisión atómica con plasma de nitrógeno.

Con el fin de demostrar que la disminución de concentración de Cr(VI) en el medio de cultivo de bacteria se debe al proceso de reducción, en esta parte de trabajo se llevó a cabo el análisis de especiación de Cr(III)/Cr(VI). Como ya se describió en la parte introductoria, estos son los dos estables estados de oxidación del cromo, predominantes en el medio ambiente, siendo las especies de Cr(VI) altamente solubles y las de Cr(III) escasamente solubles, sobre todo en ambientes del pH neutro o ligeramente alcalino [92, 93].

El análisis de especiación se refiere a las actividades analíticas para identificar o medir las concentraciones de una o más especies químicas presentes en una muestra. Muchos de los procedimientos para el análisis de especiación de Cr requieren más de un paso, ya sea extracción, filtración y en algunas ocasiones acidificación lo que puede provocar un cambio en la distribución de las especies. Sumado a esto se requiere la determinación total del metal de interés.

En cuanto a los sistemas de detección en el análisis de especiación del cromo, el más potente es sin duda la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Esta técnica presenta importantes ventajas en términos de muy alto poder de detección, amplio rango lineal, inexistencia de interferencias químicas, capacidad del análisis isotópico y fácil acoplamiento con LC; sin embargo, no es libre de dificultades. El plasma no tolera altas concentraciones de sales y de compuestos orgánicos, por lo que solamente se pueden analizar muestras diluidas y, en caso de acoplamiento con LC, la composición de la fase móvil tiene que ser compatible con los requerimientos del plasma [94]; además, en la determinación de Cr es necesario eliminar las interferencias poliatómicas ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ para $^{52}\text{Cr}^+$ y $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}^+$ para $^{53}\text{Cr}^+$). Recientemente, se ha introducido al mercado una interesante configuración instrumental, donde el espectrómetro de emisión atómica usa como fuente de excitación el plasma de nitrógeno sostenido por la energía de microondas (MP-AES 4100, Agilent Technologies). Esta técnica ofrece peores límites de detección respecto a ICP-MS, pero

permite la determinación de prácticamente todos metales, metaloides y muchos no-metales. En este caso la tolerancia a la composición de la solución aspirada al plasma es mucho mayor y, además el uso de nitrógeno disminuye drásticamente el gasto de operación. A pesar de que los espectros de emisión son más complejos que los de espectrometría de masas, en el caso de cromo en AES se presentan relativamente menos interferencias espectrales respecto ICP-MS. En comparación con espectrometría de emisión atómica con excitación en ICP (ICP-AES), no existe mucha diferencia en cuanto a límites de detección y sensibilidad, pero el MP-AES es menos limitante en cuanto a la composición de solución introducida al plasma y el análisis es mucho menos costoso. En la búsqueda bibliográfica, se han encontrado diferentes trabajos sobre el uso de MP-AES en la determinación de metales/metaloides en muestras variadas [95-98], pero hasta ahora, esta técnica no ha sido utilizada como sistema de detección en los esquemas de especiación analítica en línea.

El esquema del procedimiento utilizado en este trabajo incluye las siguientes etapas: (1) formación de complejo de Cr(III) con EDTA para obtener carga negativa de esta forma del elemento y al mismo tiempo evitar su posible oxidación; (2) separación de las dos especies negativamente cargadas (Cr(III)-EDTA y Cr(VI) en una columna de fase inversa agregando a la fase móvil hidróxido de tetrabutilamonio como contra-ión; (3) conexión de la salida de la columna con el sistema de aspiración del plasma MP y detección/cuantificación en línea del Cr por MP-AES.

Se analizaron los medios de cultivo después de 24 h de crecimiento de la cepa *B. cereus* con diferentes concentraciones de Mn(II) y Cr(VI). Para este caso se tomaron 200 μ L de medio, se centrifugo a 14 000 g, se separó el sobrenadante y se le agregó 7×10^{-2} moles de EDTA en solución para después ser incubadas a 60 °C por 30 min con el fin de completar la reacción de complejación. Finalmente, las muestras fueron introducidas en la columna con un volumen de inyección 10 μ L.

Para el proceso de calibración se prepararon las soluciones estándar conteniendo Cr(III) y Cr(VI), 0, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/L cada una, para su procesamiento igual que de las muestras (reacción con EDTA y dilución).

El cromatografo de líquidos utilizados fue modelo 1050 de Agilent Technologies y el espectrómetro fue el 4100 MP-AES con un nebulizador MiraMist de teflón con cámara de rociado ciclónica de un solo paso y presión del nebulizador de 220 kPa. La salida de la columna fue conectada con la entrada al nebulizador mediante un tubo PTFE (30 cm, 0.005 m id). Las condiciones instrumentales del análisis HPLC – MP-AES se presentan en la Tabla 12.

La Tabla 12. Condiciones experimentales utilizadas en el análisis de especiación de Cr(III)/Cr(VI) por HPLC – MP-AES.

HPLC Agilent 1050	
Columna	Eclipse XDB-C18
	5 µm
	4.6 x 150 mm
Tiempo de corrida	5 min
Flujo	1.5 mL/min
Temperatura	35 °C
Fase móvil	1% dimetilformamida
	1.5 mM TBAOH
	1.25 mM ácido cítrico
	5 mM de sulfato de amonio
	1 mM EDTA pH 5.5
Nebulizador	Concéntrico
Tiempo de lectura	3 s
Cámara de rociado	Ciclónica de un solo paso
Longitud de onda	425.433 nm

En la Figura 30, de manera de ejemplo se presentan los cromatogramas obtenidos en el proceso de calibración y en Tabla 13 se resumen los parámetros evaluados en dicho proceso.

Tabla 13. Resultados del proceso de calibración y principales parámetros analíticos evaluados en el procedimiento de especiación de Cr(III)/Cr(VI) por HPLC - MP-AES.

Analito	tiempo de retención, min	Ecuaciones de regresión lineal	Rango de calibración, mg/L	R ²	LD	LC
					ng/L	
Cr(VI)	4.0 ± 0.26	A=1441.4c-7.65	0.156 - 5	0.9993	16	41
Cr(III)	2.4 ± 0.32	A=1545.4c-33.82	0.156 - 5	0.9995	32	57

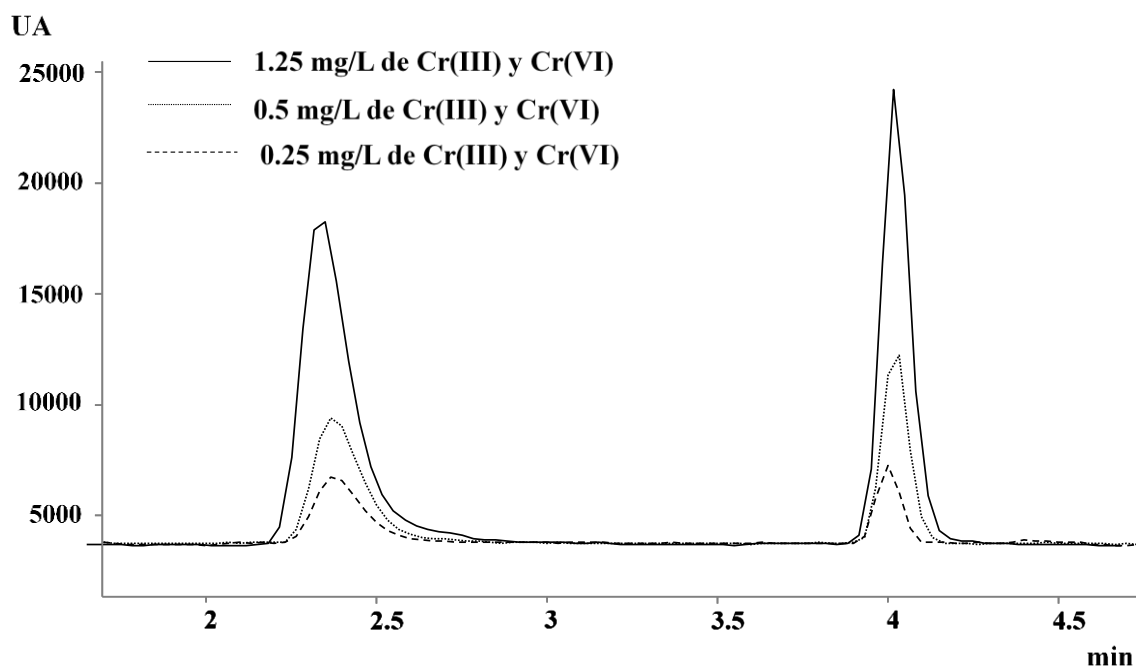


Figura 30. Cromatogramas HPLC – MP-AES representativos, obtenidos en el análisis de las soluciones de calibración (primer pico corresponde a la elución del Cr(III)-EDTA y el segundo al Cr(VI)).

Los resultados obtenidos en el análisis de los medios de cultivo con Cr(VI) y/o con Mn(II) a las 24 horas se presentan en la Figura 31 y en Tabla 14. Debido a que estos medios fueron los mismos, en los que se llevó a cabo la determinación de Cr(VI) por ensayo con DPC (sección 4.2.2), en Tabla 14 para fines comparativos se presentan los resultados de ambos procedimientos,

observándose muy buena concordancia entre las concentraciones del Cr(VI) residual encontradas después de 24 h de contacto por ambos procedimientos.

Tabla 14. Resultados de determinación de Cr(VI) por el método de 1,5-difenilcarbazida (DPC), obtenidos en el medios de cultivo a diferente tiempo de contacto con Cr(VI) y/o con Mn(II) y a las 24 horas por HPLC – MP-AES (AES). Se presentan promedios y los respectivos valores DE, mg/L con base en tres réplicas independientes.

Concentración de Cr(VI) y		Concentración residual de Cr(VI) y DE, mg/L							
Mn(II) en cultivo, mg/L		3.5 h (DPC)		6.5 h (DPC)		24 h (DPC)		24 h (AES)	
Mn(II)	Cr(VI)	Cr(VI)	DE	Cr(VI)	DE	Cr(VI)	DE	Cr(VI)	DE
0	0	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
0	35	29.8	2.6	28.7	0.4	23.8	4.5	36.0	1.4
2.9	35	29.0	0.5	25.9	2.3	10.0	1.9	9.70	0.3
5.9	35	28.5	4.7	21.1	2.2	2.11	0.2	2.07	0.9
11.8	35	24.1	2.4	17.8	1.9	0.26	0.0	1.33	0.2
11.8	50	42.0	3.0	37.2	1.6	1.54	0.3	1.66	0.2
0	50	50.7	0.6	53.3	2.3	58.1	0.8	49.1	0.1

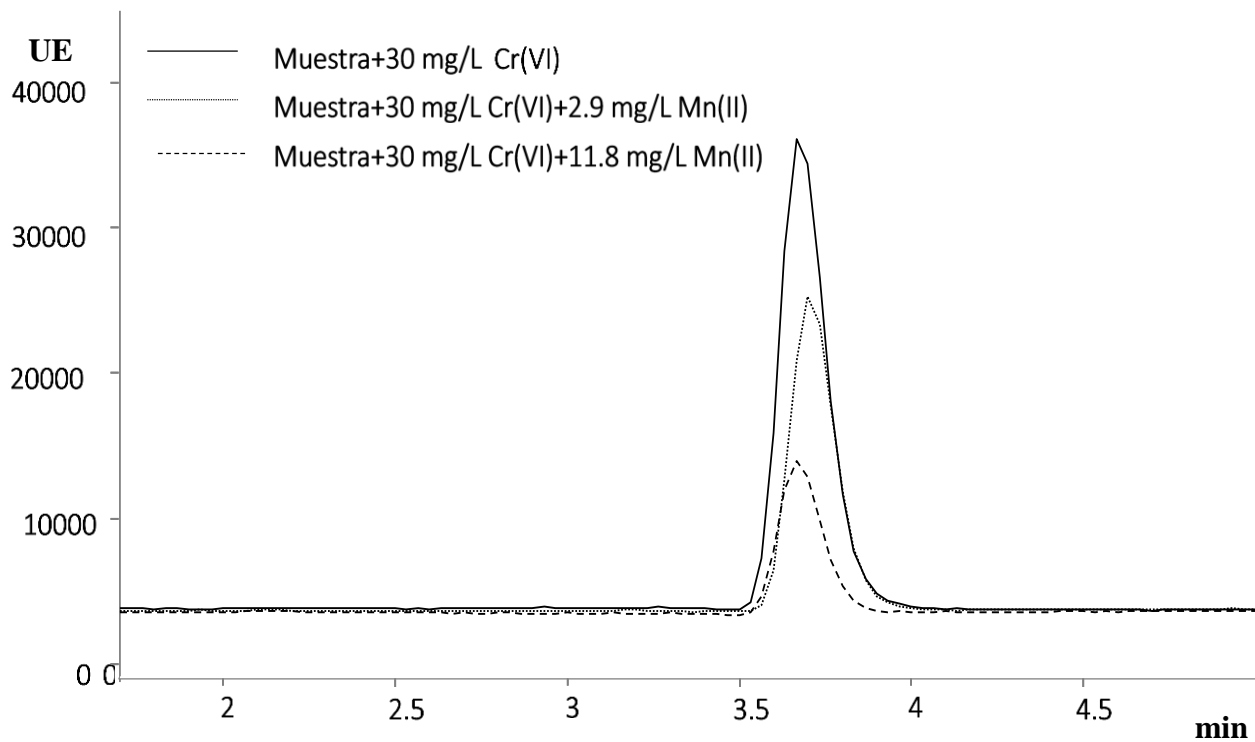


Figura 31. Cromatogramas típicos obtenidos por HPLC – MP-AES del análisis de medios de cultivo sin y con Mn(II) después de 24 hrs de crecimiento con 30 ppm? de Cr(VI).

A continuación, se llevó a cabo el análisis de un "medio gastado" al que se agregaron 30 mg/L de Cr(VI), 11.8 mg/L de Mn(II) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos del contacto. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 32.

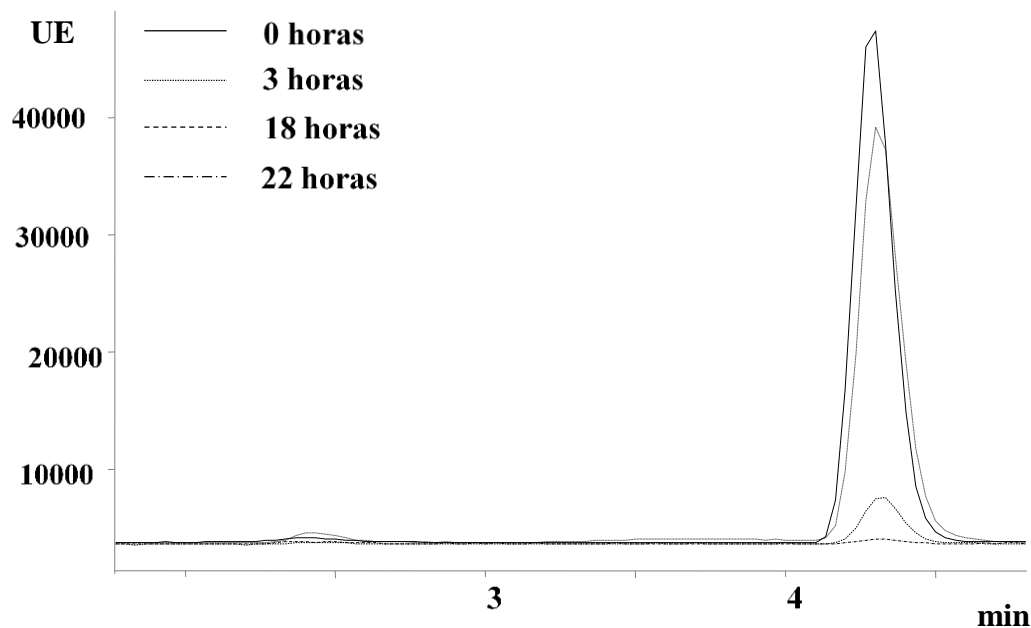


Figura 32. Cromatogramas obtenidos por HPLC – MP-AES del "medio gastado" al que se agregó 30 mg/L Cr(VI) y 11.8 mg/L Mn(II) a diferentes tiempos de contacto.

Es importante resaltar que a pesar de que el análisis de especiación confirmó la reducción del Cr(VI) por los metabolitos secretados al medio extracelular por *B. cereus*, en ninguno de los cromatogramas obtenidos para las muestras reales se observó la presencia de Cr(III). Resultados similares fueron reportados por Acevedo-Aguilar y colaboradores, al llevar a cabo el análisis de especiación de Cr en cultivos de la cepa Ed8 del hongo filamentoso *Aspergillus niger* var. *Tubingensis*, proponiéndose entonces que el cromo reducido era estabilizado inmediatamente en el medio, a través de su precipitación o complejación por otros componentes del sistema (por ejemplo ácidos carboxílicos), impidiendo de esta manera la formación del complejo Cr(III)-EDTA [99]. También, en la cepa "Enzym" de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se demostró la reducción de Cr(VI) en el medio extracelular y la formación de complejos de Cr(III) con moléculas orgánicas (Ksheminska et al., 2006). Para examinar la posible causa de la ausencia del pico Cr(III)-EDTA en cultivo de 24 horas y en el "medio gastado" de *B. cereus*, se llevó a cabo el siguiente experimento. A 500 μ L del "medio gastado", en el que 50% de Cr(VI) ya fue reducido (30 mg/L Cr(VI) + 11.8 mg/L Mn(II), 6 hrs de contacto), se le agregaron 500 μ L de una solución de Cr(III) de 15 mg/L y EDTA de igual manera que se describió anteriormente. A

otra alícuota del mismo medio se le agregó directamente el complejo Cr(III)-EDTA ya preparado (15 mg/L Cr(III)). Por último, una tercera alícuota fue incubada con EDTA con las condiciones anteriores. Los cromatogramas obtenidos de este experimento se presentan en la Figura 33; es importante resaltar que el medio gastado al agregar Cr(III), Cr(III)-EDTA o EDTA fue dos veces diluido, por lo que la señal de Cr(VI) en medio gastado sin dilución (línea sólida en la Figura 33) tiene magnitud dos veces más alta respecto a otros dos cromatogramas (área del pico).

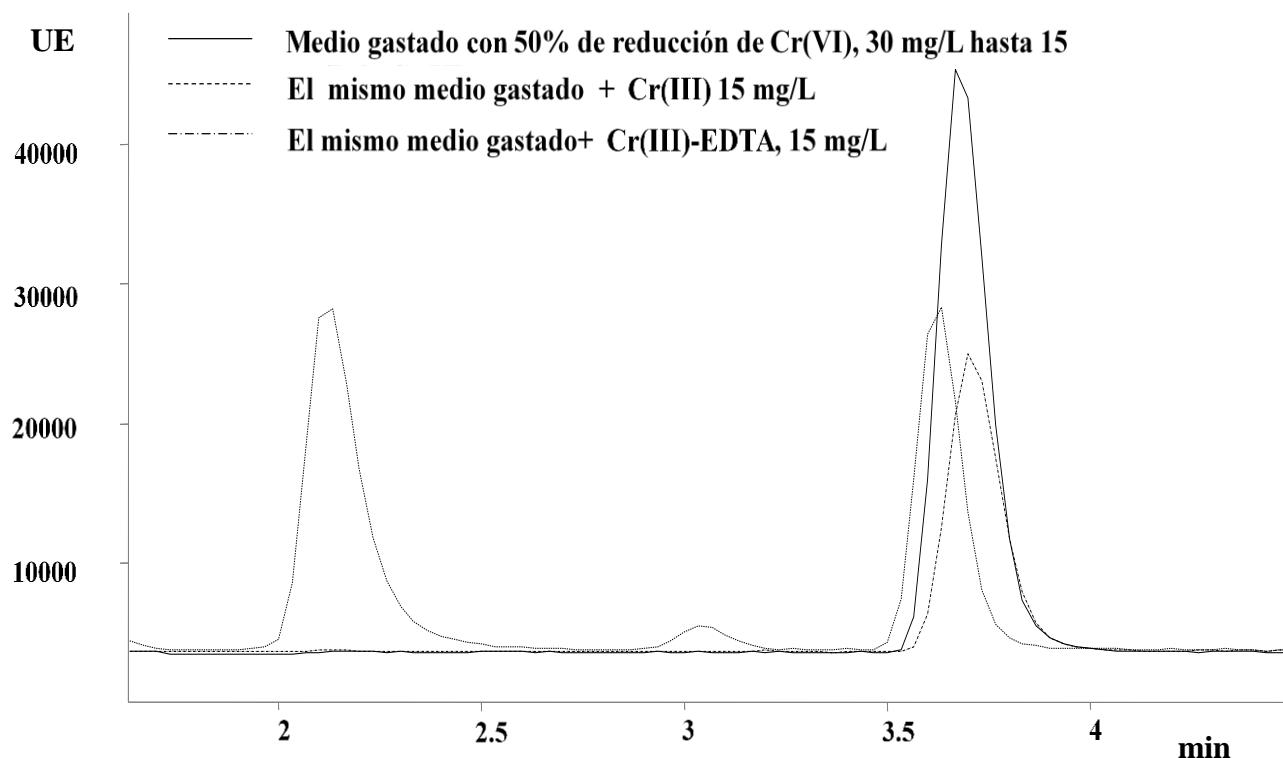


Figura 33. Cromatogramas obtenidos por HPLC – MP-AES del "medio gastado" con 50% de reducción de 30 ppm Cr(VI) inicialmente agregado, para el mismo medio con adición de Cr(III) y con adición de Cr(III)-EDTA. Al agregar Cr(III), Cr(III)-EDTA o EDTA, el medio fue adicionalmente diluido dos veces.

Esta Figura 33 muestra claramente que el Cr(III)-EDTA aparece en el cromatograma, solamente cuando se agrega al medio el complejo ya formado. En primer lugar este resultado indica que el procedimiento HPLC – MP-AES es adecuado para la separación/cuantificación de Cr(III)-EDTA/Cr(VI). Por otro lado, queda demostrado que el Cr(III) presente en el medio de cultivo no forma complejo con EDTA, este efecto se debe a la estabilización inmediata de Cr(III) mediante su precipitación o acomplamiento por otros componentes del medio, por ejemplo, ácidos

carboxílicos. Dicha estabilización del Cr(III) en el medio de cultivo es un efecto deseado para una posible aplicación de *B. cereus* en la remediación de ambientes contaminados, donde no solamente la reducción efectiva de Cr(VI) es importante, pero también la estabilización del Cr(III) para evitar su posible re-oxidación.

5. CONCLUSIONES

Este proyecto de tesis consistió de dos partes, ambas dirigidas a la introducción al estudio metabolómico de los organismos vivos expuestos a Cr(VI).

En la primera parte, se examinó la factibilidad del uso de la técnica GC-FID, previa derivatización con BSTFA, en la detección de cambios en los perfiles de metabolitos en respuesta al estrés provocado por el Cr(VI) en dos tipos de plantas: *L. sativum* y *H. annuus*. Para detectar los metabolitos involucrados en la respuesta al estrés, se llevó a cabo el análisis multivariante por el método de componentes principales (PCA). Finalmente, se realizaron algunas pruebas para la identificación de los metabolitos, preseleccionados en los análisis anteriores con base en sus tiempos de retención, utilizando la técnica de cromatografía de gases con detector másico (GC-MS). Los resultados obtenidos en esta primera parte demostraron la factibilidad de este esquema de análisis en la detección/identificación de metabolitos involucrados en la respuesta del organismos al estrés abiótico impuesto por el Cr(VI). En cuanto a los resultados de relevancia biológica, se necesitan más experimentos y el análisis más profundo para poder formular las conclusiones contundentes.

Una vez demostrada la utilidad de la combinación de los datos GC-FID con el análisis PCA, la segunda parte de trabajo se enfocó en la reducción de Cr(VI) por la bacteria *B. cereus*, aislada previamente de un ambiente contaminado con desechos de tenería. En este caso, se utilizó el mismo procedimiento basado en GC-FID y PCA. Asimismo, se ha propuesto un nuevo procedimiento de especiación de Cr(III)/Cr(VI). La aportación original consistió en el acoplamiento de la separación cromatográfica con el espectrómetro MP-AES para la detección/cuantificación de Cr. Para la separación de Cr(III) y Cr(VI) en una columna de fase inversa, la muestra fue incubada (60 °C, 30 min) con EDTA formando el complejo Cr(III)-EDTA y se agregó a la fase móvil el TBAOH como par-iónico logrando la separación de las dos

especies en un tiempo de 5 min. La ventaja del procedimiento propuesto, además de su bajo costo, es una mejor tolerancia de plasma de microondas a presencia de sales y compuestos orgánicos, respecto ICP-MS o ICP-AES. Los resultados obtenidos de los medios de cultivo con microorganismos y "medios gastados", que estuvieron en contacto durante 3 y hasta 24 horas con diferentes concentraciones de Cr(VI) y Mn(II) demostraron que el ácido oxálico participa en la reducción de Cr(VI) por *B. cereus* y que dicho proceso ocurre en el espacio extracelular a pH neutro, adecuado para un buen crecimiento de la bacteria. Asimismo, utilizando diferentes técnicas y procedimientos analíticos, se ha encontrado que el Mn(II) agregado al medio de cultivo actúa como facilitador del proceso de reducción. Por su parte, los resultados del análisis de especiación de cromo confirmaron la reducción de Cr(VI) en el sistema estudiado y también mostraron la estabilización inmediata del cromo reducido de tal manera que este no formaba el complejo con EDTA. Este resultado es muy alentador en cuanto a posible futuro uso de *B. cereus* en biorremediación. El trabajo futuro se enfocará en la elucidación del mecanismo molecular de la reducción de Cr(VI) por el ácido oxálico en presencia de Mn(II).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Lay Jr, J.O., et al., *Problems with the "omics"*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(11): p. 1046-1056.
2. Beyoğlu, D. and J.R. Idle, *Metabolomics and its potential in drug development*. Biochemical Pharmacology, 2013. **85**(1): p. 12-20.
3. Adamski, J. and K. Suhre, *Metabolomics platforms for genome wide association studies—linking the genome to the metabolome*. Current Opinion in Biotechnology, 2013. **24**(1): p. 39-47.

4. Huang, D., et al., *An integrated plasma and urinary metabonomic study using UHPLC–MS: Intervention effects of Epimedium koreanum on 'Kidney-Yang Deficiency syndrome' rats*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **76**(0): p. 200-206.
5. Zhang, Z.-H., et al., *Metabonomic study of biochemical changes in the rat urine induced by Pinellia ternata (Thunb.) Berit*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **85**(0): p. 186-193.
6. Armitage, E.G. and C. Barbas, *Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (0).
7. Petrescu, A.-J., M.R. Wormald, and R.A. Dwek, *Structural aspects of glycomes with a focus on N-glycosylation and glycoprotein folding*. Current Opinion in Structural Biology, 2006. **16**(5): p. 600-607.
8. Pérez, S. and B. Mulloy, *Prospects for glycoinformatics*. Current Opinion in Structural Biology, 2005. **15**(5): p. 517-524.
9. Hu, C., et al., *Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(26): p. 2836-2846.
10. Lam, S.M. and G. Shui, *Lipidomics as a Principal Tool for Advancing Biomedical Research*. Journal of Genetics and Genomics, 2013. **40**(8): p. 375-390.
11. Smékalová, V., et al., *Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants*. Biotechnology Advances, (0).
12. Kushalappa, A.C. and R. Gunnaiah, *Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes*. Trends in Plant Science, 2013. **18**(9): p. 522-531.
13. Jacob, C., V. Jamier, and L.A. Ba, *Redox active secondary metabolites*. Current Opinion in Chemical Biology, 2011. **15**(1): p. 149-155.
14. Yazaki, K., *ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites*. FEBS Letters, 2006. **580**(4): p. 1183-1191.
15. Yazaki, K., *Transporters of secondary metabolites*. Current Opinion in Plant Biology, 2005. **8**(3): p. 301-307.
16. Avudainayagam, S., et al., *Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites*. Rev Environ Contam Toxicol, 2003. **178**: p. 53-91.
17. (ATSDR), A.f.T.S.a.D.R., *Toxicological Profile for Chromium*. 1998, U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA.
18. Jacobson, E.L., D. Cervantes-Laurean, and M.K. Jacobson, *ADP-ribose in glycation and glycoxidation reactions*. Adv Exp Med Biol, 1997. **419**: p. 371-9.
19. Dayan, A., Paine, AJ, *Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000*. Human & Experimental Toxicology, 2001. **20**: p. 439 –451.
20. Mueller-Spitz, S.R., et al., *Use of SEC-ICP-MS with a collision cell for determining the interaction of chromium with DNA extracted from metal-contaminated soils*. Anal Bioanal Chem, 2006. **386**(1): p. 142-51.
21. Hawley, G.G., *Diccionario de Química Analítica y de Productos Químicos*. 1975(Ediciones Omega, S. A.): p. 249.
22. Sawada, A., et al., *Removal of Cr(VI) from contaminated soil by electrokinetic remediation*. Waste Manag, 2004. **24**(5): p. 483-90.
23. Padarauskas, A.V., Kazlauskienė, L.G., *Ion-pair chromatographic determination of chromium(VI)*. Talanta, 1993. **40**(6): p. 827-830.
24. Kim, S.D., K.S. Park, and M.B. Gu, *Toxicity of hexavalent chromium to Daphnia magna: influence of reduction reaction by ferrous iron*. J Hazard Mater, 2002. **93**(2): p. 155-64.

25. Puzon, G.J., et al., *Formation of Soluble Organo-Chromium(III) Complexes after Chromate Reduction in the Presence of Cellular Organics*. Environmental Science and Technology, 2005. **39**(8): p. 2811-2817.
26. Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., *Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals*. Nature, 1988. **333**: p. 134-139.
27. Pérez-Padilla, A., Tavanib, LD, *Treatment of an industrial effluent by reverse osmosis*. Desalination, 1999. **126**: p. 219–226.
28. Bajza, Z., Hitrec, P, Mužic, M, *Influence of different concentrations of Al₂(SO₄)₃ and anionic polyelectrolytes on tannery wastewater flocculation*. Desalination, 2004. **171**: p. 13-20.
29. Tavani E. L., V.C., *Adsorption of Cr(III) from a tanning wastewater on kaolinite*. J. Soc. Leather Technologists and Chemists, 1997. **81**: p. 143 - 148.
30. Kamaludeen, S.P., et al., *Chromium-microorganism interactions in soils: remediation implications*. Rev Environ Contam Toxicol, 2003. **178**: p. 93-164.
31. Katz, S.A. and H. Salem, *The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review*. J Appl Toxicol, 1993. **13**(3): p. 217-24.
32. Wong, P.T., Trevors, j. T., *Chromium toxicity to algae and bacteria*. In: Nriagu, JO & Nieboer E (Eds) *Chromium in the Natural and Human Environments*. 1988. **Wiley, New York**: p. 305 - 315.
33. Richard F.C., B.A.C.M., *Aqueous geochemistry of chromium: a review*. Water Res., 1991. **25**: p. 807-816.
34. O'Brien, T.J., S. Ceryak, and S.R. Patierno, *Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms*. Mutat Res, 2003. **533**(1-2): p. 3-36.
35. Vonderheide, A.P., et al., *Retention of Cr(III) by high-performance chelation ion chromatography interfaced to inductively-coupled plasma mass spectrometric detection with collision cell*. J Chromatogr A, 2004. **1024**(1-2): p. 129-37.
36. Richard, F.C., Bourg A.C.M., *Aqueous geochemistry of chromium: a review*. Water Res., 1991. **25**: p. 807-816.
37. Eary, L.E., Rai, D., *Chromate removal from aqueous wastes by reduction with ferrous ion*. Environ. Sci. Technol., 1988. **22**: p. 972-977.
38. Dubbin, W.E., *Influence of organic ligands on Cr desorption from hydroxy-Cr intercalated montmorillonite*. Chemosphere, 2004. **54**(8): p. 1071-7.
39. James, B., Bartlett, RJ, *Behavior of chromium in soils: V. Fate of organically complexed Cr(III) added to soil*. J Environ Qual, 1983. **12**: p. 169–172.
40. Schlautman, M.A. and I. Han, *Effects of pH and dissolved oxygen on the reduction of hexavalent chromium by dissolved ferrous iron in poorly buffered aqueous systems*. Water Res, 2001. **35**(6): p. 1534-46.
41. Kornhauser, C., et al., *Possible adverse effect of chromium in occupational exposure of tannery workers*. Ind Health, 2002. **40**(2): p. 207-13.
42. Kamaludeen, S.P., et al., *Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil*. Ecotoxicol Environ Saf, 2003. **56**(2): p. 302-10.
43. Kim, J., Dixon, JB, Chusuei, CC, Deng, Y, *Oxidation of Chromium(III) to (VI) by Manganese Oxides*. Soil Sci. Soc. Am. J., 2002. **66**: p. 306–315.
44. Friess, S.L., *Carcinogenic risk assessment criteria associated with inhalation of airborne particulates containing chromium (VI/III)*. Sci Total Environ, 1989. **86**(1-2): p. 109-12.
45. Hartwig, A., *Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis?* Free Radical Biology and Medicine, 2013. **55**(0): p. 63-72.

46. Zhitkovich, A., *Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks*. Chemical Research in Toxicology, 2011. **24**(10): p. 1617-1629.
47. Shanker, A.K., et al., *Chromium toxicity in plants*. Environment International, 2005. **31**(5): p. 739-753.
48. Dhal, B., et al., *Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review*. J Hazard Mater, 2013. **250-251**: p. 272-91.
49. Barrera-Diaz, C.E., V. Lugo-Lugo, and B. Bilyeu, *A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction*. J Hazard Mater, 2012. **223-224**: p. 1-12.
50. Poljsak, B., et al., *Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review*. J Basic Microbiol, 2010. **50**(1): p. 21-36.
51. Chen, Z., et al., *Cr(VI) uptake mechanism of Bacillus cereus*. Chemosphere, 2012. **87**(3): p. 211-216.
52. Puzon, G.J., et al., *Formation of soluble organochromium (III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics*. Environ Sci Technol, 2005. **39**: p. 2811-2817.
53. Gutierrez Corona, J.F., et al., *Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos*. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal, 2010. **1**: p. 47-63.
54. Coreno-Alonso, A., et al., *Cr(VI) reduction by an Aspergillus tubingensis strain: role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination*. Chemosphere, 2009. **76**(1): p. 43-7.
55. Jiang, D., et al., *Photocatalytic reduction of Cr(VI) by small molecular weight organic acids over schwertmannite*. Chemosphere, 2012. **89**(7): p. 832-7.
56. Lan, Y.Q., et al., *Influence of clay minerals on the reduction of Cr⁶⁺ by citric acid*. Chemosphere, 2008. **71**(4): p. 781-787.
57. Yang, J.W., et al., *Interaction between Cr(VI) and a Fe-rich soil in the presence of oxalic and tartaric acids*. Environmental Geology, 2008. **53**(7): p. 1529-1533.
58. Sarkar, B., et al., *Manganese(II)-Catalyzed and Clay-Minerals-Mediated Reduction of Chromium(VI) by Citrate*. Environmental Science & Technology, 2013. **47**(23): p. 13629-13636.
59. Brose, D.A. and B.R. James, *Hexavalent Chromium Reduction in Solution and in Chromite Ore Processing Residue-Enriched Soil by Tartaric Acid with Isopropyl Alcohol and Divalent Manganese as Co-Reductants*. Journal of Environmental Quality, 2013. **42**(3): p. 766-773.
60. Khan, Z., M. Akram, and Kabir-Ud-Din, *A kinetic study of the one-step three-electron oxidation of citric acid by chromium(VI)*. Oxidation Communications, 2001. **24**(2): p. 257-267.
61. Khan, Z. and Kabir-ud-Din, *Unusual stabilization of manganese(III) during the cooxidation of dimethylformamide and manganese(II) by chromium(VI)*. Transition Metal Chemistry, 2001. **26**(4-5): p. 481-486.
62. Li, C., Y.Q. Lan, and B.L. Deng, *Catalysis of manganese(II) on chromium(VI) reduction by citrate*. Pedosphere, 2007. **17**(3): p. 318-323.
63. Gullberg, J., et al., *Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2004. **331**(2): p. 283-295.
64. Tsugawa, H., et al., *Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014. **117**(1): p. 122-128.
65. Roux, A., et al., *Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review*. Clinical Biochemistry, 2011. **44**(1): p. 119-135.

66. Ibáñez, C., et al., *Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **802**(0): p. 1-13.
67. Katayama, A., et al., *Bioavailability of xenobiotics in the soil environment*. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2009. **203**: p. 1-86.
68. Cervantes, C., et al., *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. *FEMS Microbiol Rev*, 2001. **25**(3): p. 335-47.
69. Klonowska, A., et al., *Hexavalent chromium reduction in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough causes transitory inhibition of sulfate reduction and cell growth*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008. **78**(6): p. 1007-16.
70. Chen, Z., et al., *Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus**. *Chemosphere*, 2012. **87**(3): p. 211-6.
71. Vargas-Garcia, M.D., et al., *Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: In vitro selection*. *Sci Total Environ*, 2012. **431C**: p. 62-67.
72. Acevedo-Aguilar, F.J., et al., *Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes*. *Can J Microbiol*, 2006. **52**(9): p. 809-15.
73. Sag, Y. and T. Kutsal, *Determination of the biosorption heats of heavy metal ions on *Zoogloea ramigera* and *Rhizopus arrhizus**. *Biochem Eng J*, 2000. **6**(2): p. 145-151.
74. Fukuda, T., et al., *Cr(VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits*. *J Gen Appl Microbiol*, 2008. **54**(5): p. 295-303.
75. Lai, H.Y., K.W. Juang, and Z.S. Chen, *Large-area experiment on uptake of metals by twelve plants growing in soils contaminated with multiple metals*. *Int J Phytorem*, 2010. **12**: p. 785-797.
76. Ali, H., E. Khan, and M.A. Sajad, *Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications*. *Chemosphere*. **91**(7): p. 869-81.
77. Fozia, A., et al., *Effect of chromium on growth attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.)*. *Journal of Environmental Sciences*, 2008. **20**(12): p. 1475-1480.
78. Huber, C.F. and G.P. Haight, *The oxidation of manganese(II) by chromium(VI) in the presence of oxalate ion*. *Journal of the American Chemical Society*, 1976. **98**(14): p. 4128-4131.
79. Ramírez-Ramírez, A. and B.-C. N., *Tolerancia y reducción de cromo(VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre*. *Revista de Ciencias*, Universidad del Valle, Colombia, 2014. **en prensa**.
80. Benitez-Campo, N. and F. Gutierrez Corona, *Diseño de un medio de cultivo económico para la reducción de Cr(VI) y exploración de la presencia del gen codificante de la proteína chrA en *Bacillus cereus* A1 y *Enterobacter cloacae* C1a*. Informe final de los becarios extranjeros, 2013.
81. De-Eknamkul, W. and B. Potduang, *Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units*. *Phytochemistry*, 2003. **62**(3): p. 389-398.
82. Ruiz-Matute, A.I., et al., *Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses*. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(17-18): p. 1226-1240.
83. Prado, C., et al., *Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism*. *Journal of Hazardous Materials*, 2010. **177**(1-3): p. 546-553.
84. Cheung, K.H. and J.-D. Gu, *Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007. **59**(1): p. 8-15.
85. Das, S., et al., *Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil*. *Chemosphere*, 2014. **96**(0): p. 112-121.

86. Wang, Y.-T. and C. Xiao, *Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria*. Water Research, 1995. **29**(11): p. 2467-2474.
87. Xu, Z., et al., *Photocatalytic reduction of Cr(VI) by citric and oxalic acids over biogenetic jarosite*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(4): p. 2192-6.
88. Kabir-Ud-Din, K. Hartani, and Z. Khan, *Effect of micelles on the oxidation of oxalic acid by chromium(VI) in the presence and absence of manganese(II)*. Colloids Surface A, 2001. **193**: p. 1-13.
89. Khan, Z., et al., *Kinetics and mechanism of chromic acid oxidation of oxalic acid in absence and presence of different acid media, a kinetic study*. International Journal of Chemical Kinetics, 1998. **30**(5): p. 335-340.
90. Buerge, I.J. and S.J. Hug, *Influence of organic ligands on chromium(VI) reduction by iron(II)*. Environmental Science & Technology, 1998. **32**(14): p. 2092-2099.
91. Sun, J., et al., *Fe(III) photocatalytic reduction of Cr(VI) by low-molecular-weight organic acids with -OH*. J Hazard Mater, 2009. **168**: p. 1569-1574.
92. Beverskog, B. and I. Puigdomenech, *Revised pourbaix diagrams for chromium at 25-300 °C*. Corrosion Science, 1997. **39**(1): p. 43-57.
93. Kotaś, J. and Z. Stasicka, *Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation*. Environmental Pollution, 2000. **107**(3): p. 263-283.
94. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Metal Analysis (ICP-OES and ICP-MS)*, in *Applications of physical methods to inorganic and bioinorganic chemistry. Encyclopedia of Inorganic Chemistry (vol 11)*, R.E. Scott and C.M. Lukehart, Editors. 2007, John Wiley & Sons p. 205-225.
95. Teodoro, M.S., D. Schiavo, and M. Ferreira Abreu, *Determination of metals in soil by microwave plasma - atomic emission spectrometry (MP-AES) using DTPA extraction*. Agilent Technologies Application Note, Publication number: 5991-2961EN, 2013.
96. Li, W., et al., *Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer*. Talanta, 2013. **112**: p. 43-48.
97. Drvodelic, N. and J. Cauduro, *Determination of metals in wine using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer*. Agilent Technologies Application Note, Publication number: 5991-1586EN, 2013.
98. Balaram, V., et al., *Determination of precious metals in rocks and ores by microwave plasma-atomic emission spectrometry for geochemical prospecting studies*. Current Science, 2013. **104**(9): p. 1207-1215.
99. Acevedo Aguilar, F.J., et al., *Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi*. Anal Bioanal Chem, 2008. **392**: p. 269-276.