

## Determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en plántulas de girasol expuestas a Cr (VI) y/o *Trichoderma harzianum*

Diego Jiménez-Arana<sup>1</sup>, Pedro M. Marín-Chavéz<sup>1</sup>, Cesar A. Rangel-Alfaro<sup>1</sup>, Natalia F. Salazar-Valdez<sup>1</sup>, Katarzyna Wrobel<sup>1</sup>, Alma R. Corrales-Escobosa

<sup>1</sup> Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato  
alma\_rce@ugto.mx

### Resumen

Este estudio se llevó a cabo la determinación de compuestos fenólicos totales libres, flavonoides totales y la capacidad antioxidante en las plántulas de girasol (*Helianthus annuus*) expuestas a 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI) y en interacción con *Trichoderma harzianum*, con la finalidad de avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de plántulas de girasol a Cr (VI) y evaluar un posible efecto protector de una cepa de *T. harzianum* a estrés abiótico a través de la síntesis de estos metabolitos.

Para ello, las semillas de girasol fueron germinada y cultivadas en un sistema hidropónico casero durante 7 días hasta obtener plántulas de girasol. Una vez obtenidas las plántulas se realizaron la aplicación de cuatro tratamientos: 1) Control; 2) *T. harzianum*; 3) 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI) y 4) 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI) + *T. harzianum*. Después de 5 días las plántulas fueron cosechadas y separadas en parte aérea y raíz. Las muestras fueron liofilizadas y se llevó la extracción de metabolitos con etanol al 80 % e inmediatamente realizó la determinación de compuestos fenólicos libres, flavonoides totales y capacidad antioxidante mediante el empleo de métodos espectrofotométricos.

**Palabras clave:** plántula de girasol, Cr (VI), Extracto etanólico, polifenoles, capacidad antioxidante, flavonoides.

### Introducción

Al ser organismos sésiles, una planta al largo de su vida se enfrenta a diversas condiciones de estrés (tanto biótico como abiótico) que pueden modificar los procesos fisiológicos y metabólicos "normales" de crecimiento y desarrollo. Para hacer frente a ello, las plantas han desarrollado diversos mecanismos fisiológicos, bioquímicos y/o moleculares de tolerancia y resistencia a los diferentes tipos de estrés y que actúan para restaurar la homeostasis celular o reducir los efectos nocivos a través de respuestas reguladoras, por ejemplo, con cambio en la expresión de genes, proteínas o síntesis de metabolitos implicados en las interacciones entre la planta y su entorno <sup>1</sup>.

Los compuestos fenólicos son un grupo diversos de metabolitos secundarios que juegan papeles fisiológicos cruciales a lo largo de la vida de la planta y generalmente están involucrados en la defensa contra el estrés abiótico o la agresión de patógenos <sup>2-3</sup>. La estructura de los compuestos fenólicos varía ampliamente, aunque su característica común es la presencia de uno (fenoles simples) o más (polifenoles) grupo hidroxilo sustituyente, que está unido directamente a uno más anillos aromáticos o de benceno. De acuerdo con su estructura, se puede agrupar en ácido fenólicos, flavonoides y no flavonoides. La estructura de los polifenoles influye significativamente en los procesos y actividad biológica y por lo tanto en la respuesta al estrés de la planta. Por ejemplo, la capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus derivados está relacionada principalmente con el número de grupos hidroxilo. Los antioxidantes son compuestos que retardan o previenen la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones oxidándose ellos mismos.

Entre los tipos de estrés abiótico más comúnmente en plantas se encuentra el ocasionado los metales pesados. Sin embargo, algunas especies de planta se utilizan en proceso de fitorremediación. Los procesos pueden variar dependiendo del metal o de la del tipo de planta pero puede incluir la fitoextracción (captación de metales por las raíces y colecta en tallos y hojas, fitodegradación (degradación de las plantas de

compuestos orgánicos), rizofiltración (uso de las raíces para descontaminar aguas), fitoestabilización (plantas para remover contaminantes inorgánicos y orgánico) o fitovolatilización (conversión de contaminantes del agua del suelo en especies que se liberan en la atmósfera). Aunado a ello, en los últimos años se ha propuesto la remediación de sitios contaminados con metales pesados mediante la fitorremediación asistida por microorganismos para la descontaminación de suelos contaminados con metales pesados<sup>4</sup>. La contribución de los microorganismos benéficos en el proceso de fitorremediación son: a) mejorar el crecimiento y fisiológica de la planta, b) Incrementar la tolerancia de la planta a el estrés por metales pesado, c) incrementar/disminuir la acumulación de metales pesados, d) reducción del nivel de estrés, e) mejorar en la adquisición de agua y nutrientes, f) incremento en la materia orgánica del suelo y por lo tanto la fertilidad. Así pues, el empleo de plantas y microorganismos benéficos para bioremediar sitios contaminados por metales pesados puede ser una herramienta útil para descontaminar los suelos, reduciendo los costos de acciones tradicionales.

La absorción, distribución, especiación y efectos tóxicos de Cr (VI) en varias especies de plantas está bien documentado<sup>5</sup>. La planta de girasol (*Helianthus annuus*) se han empleado en diversos estudios por su capacidad como una herramienta en para la fitorremediación<sup>6</sup>.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de compuestos fenólicos totales libres, flavonoides totales y actividad la antioxidante en extractos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y en interacción con *Trichoderma harzianum*, con la finalidad de avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de plántulas de girasol a Cr (VI) y evaluar un posible efecto protector de una cepa de *T. harzianum* a estrés abiótico a través de la síntesis de estos metabolitos.

La selección de planta de girasol se basó en la demostrada tolerancia de *Helianthus annuus* bajo el estrés a metales pesado, específicamente Cr (VI)<sup>7</sup> y su potencial papel en la fitorremediación, mientras que *T. harzianum* es una cepa de un hongo comercial bioestimulantes para diversos cultivos por su potencial capacidad en la estimulación y producción de metabolitos.

## Materiales y métodos

### Obtención de muestras biológicas

Las plántulas de girasol fueron obtenidas utilizando sistemas hidropónicos caseros. Previo a la germinación, las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L., marca Vita) fueron desinfectadas con una solución de NaClO al 3 % (15 min) y 3 lavados con agua destilada estéril. Posterior a la desinfección, las semillas secas fueron colocadas en obscuridad en una charola con papel filtro húmedo hasta la germinación (3 días aproximadamente) y posteriormente se traspasaron un sistema hidropónico casero colocando 15 semillas sobre una malla en cada contenedor y 100 mL de la solución nutritiva Hoagland (CaNO<sub>3</sub> a 0.35 mM, CaCl<sub>2</sub> a 2.1 mM, MgSO<sub>4</sub> a 0.91 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 97 mM, KNO<sub>3</sub> a 1.22 mM, HBO<sub>3</sub> 23 μM, MnCl<sub>2</sub> a 3.9 μM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> a 0.5 μM, ZnNO<sub>3</sub> a 0.6 μM, FeNO<sub>3</sub> a 10 μM, CuSO<sub>4</sub> a 0.5 μM a un pH 5.8). Una vez montado los sistemas hidropónicos, cada contenedor fue colocado en una cámara de crecimiento controlando temperatura 28 ° C (± 2°C), la humedad de 60 %C y los ciclos de luz y obscuridad (16 horas de luz/12 horas de obscuridad) hasta la obtención de plántulas (aproximadamente 5 días).

Una vez obtenidas las plántulas, estas fueron transferidas a 100 mL de medio Hoagland nuevo y expuestas a uno de los siguientes tratamientos (tres repeticiones biológicas por tratamiento: R1, R2, R3, con 15 plántulas por contenedor):

- Control
- 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI)
- Trichoderma harzianum* (*T. h*) (1 x 10<sup>4</sup> conidios)
- 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI) + *Trichoderma harzianum* (*T. h*) (1 x 10<sup>4</sup> conidios)

Después de 5 días de exposición, las plántulas de los cultivos hidropónicos fueron recolectadas, y separando la parte aérea (brote) de la raíz y almacenadas a -20 °C y liofilizadas. Después de la liofilización se determinó la biomasa seca (BS) total en cada contenedor.

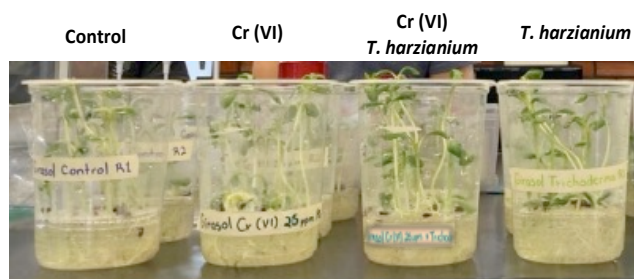


Figura 1. Cultivos hidropónicos de plántulas de girasol al inicio del estrés abiótico con Cr (VI) y/o *T. harzianium*

### Determinación de compuestos polifenólicos libres, capacidad antioxidante y flavonoides totales

La **extracción de metabolitos** se realizó a partir de la homogeneización de 10 mg de biomasa liofilizada (proveniente de parte aérea o raíz) con 2 mL de etanol al 80 %. Las muestras fueron sonicadas por 30 min y centrifugadas a 12 000 x g por 10 min y el sobrenadante (extracto etanólico) colocado a un tubo nuevo <sup>8</sup>.

La determinación de los **compuestos fenólicos totales libres** se realizó utilizando por el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) <sup>9</sup>. Para ello en una microplaca tipo Elisa de 96 pocillos, se colocó en un pocillo 10  $\mu\text{L}$  de muestra (extracto etanólico de raíz o brote), 40  $\mu\text{L}$  agua, 50  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu 5 veces diluido y 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.35 M y se incubó entre 3-10 min para leer la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro (Multiskan™ GO de Thermo Scientific™). Se utilizó el método de calibración externa utilizando como estándar a ácido gálico (0.0 – 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Las soluciones de calibración fueron preparadas a partir de un estándar de ácido gálico de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se expresan como mg equivalentes de ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca (liofilizada).

La determinación de la **capacidad antioxidante** se realizó mediante el ensayo de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio)<sup>10</sup>. Para ello, un día previo a realizar el estudio, se preparó una solución de ABTS a 7.04 mM y una solución  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 3.45 mM, las cuales se mezclaron 1:1 (v/v) y se dejó reaccionar de 12 -16 horas para la formación del radical ( $\text{ABTS}^{\cdot-}$ ). Una vez transcurrido el tiempo y antes de iniciar el análisis, la solución con el radical formado se diluyó en agua en una relación 1:20, esto con la finalidad de obtener una absorbancia  $1.5 \pm 0.2$  unidades de absorbancia (UA) a 734 nm. Una vez ajustada esta solución, se llevó a cabo la preparación 5 puntos de la curva de calibración con el ácido gálico como estándar (rango de concentración 0.0 – 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a partir de una solución de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hasta completar 100  $\mu\text{L}$  de volumen con etanol al 80 %. Las muestras se prepararon tomando 50  $\mu\text{L}$  de extracto etanólico de raíz o brote, 50  $\mu\text{L}$  etanol al 80 % y la adición del ABTS. Tanto a curva de calibración como a las muestras se les adicionó 900  $\mu\text{L}$  de la solución con ABTS. Después de 3-10 min de incubación en oscuridad, se leyó su absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro. La curva de calibración fue por el método de mínimos cuadrados graficando en el eje de las Y, a la lectura de UA a 734 nm de los puntos de calibración (para lo cual la lectura del valor de blanco se le restó el valor de la lectura de UA de cada punto de calibración) y en eje de las X, la concentración en  $\mu\text{g}$  de AG  $\text{mL}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se expresan como mg equivalentes de ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca (liofilizada).

La determinación de **flavonoides totales** fue usando el método de cloruro de aluminio <sup>11</sup> Brevemente, en un tubo eppendorf se tomó 450  $\mu\text{L}$  del extracto etanólico de la raíz o 150  $\mu\text{L}$  del extracto etanólico de la parte aérea y 300  $\mu\text{L}$  de agua e inmediatamente se procedió a la reacción añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  a 1M, 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y finalmente se agregó 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Para realizar la curva de calibración, se tomó 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{L}$  del estándar de rutina a 1  $\text{mg mL}^{-1}$  en metanol (rango de concentración 0.0 – 42  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar 450  $\mu\text{L}$  y se siguió el mismo procedimiento para la reacción que el descrito para las muestras. La mezcla de reacción fue incubada 10 min a temperatura ambiente y 200  $\mu\text{L}$  de las muestras y/o estándares fueron transferidos a las microplacas para su lectura en el espectrofotómetro (Multiskan™ GO de Thermo Scientific™) a 510 nm. Los resultados obtenidos de flavonoides totales en las muestras se expresan como mg equivalentes de rutina  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca (BS) liofilizada.

## Resultados y discusión

La finalidad de este trabajo es avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y evaluar un posible efecto protector de una cepa de *T. harzianium* a estrés abiótico, mediante la determinación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante extractos de plántulas de raíz y/o brote. Por ello, se expusieron a plántulas de girasol a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr (VI) en presencia y ausencia de *T. harzianium*. Adicionalmente, se obtuvo un cultivo control (sin exposición a Cr (VI) o *T. harzianium*), lo que resultó 4 tratamientos en total (descrito en materiales y métodos). De cada tratamiento se obtuvo 3 réplicas biológicas con 15 plántulas cada uno.

Para el análisis de los metabolitos aplicamos un protocolo de extracción simple descrito por López-Hidalgo y col. (2020), el cual permite la rápida extracción a partir de 10 mg de muestra (biomasa de raíz o brote liofilizada) y 2 mL de etanol al 80 % y posterior sonicación de la muestra por 30 min. Después de centrifugar se puede llevar a cabo la determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante por métodos espectrofotométricos y en microplaca de 96 pocillos, por lo que la lectura de varias muestras se puede llevar a cabo de manera simultánea.

### Determinación de compuestos fenólicos libres totales

La determinación de los compuestos fenólicos libres totales se realizó utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) de un color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a la formación del ion fenolato, lo que genera un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es proporcional al contenido en fenoles totales, y presenta un máximo de absorción a 760 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Esta es una reacción redox, por lo que puede considerarse también, como un método indirecto de la actividad antioxidante total. En la figura 2, se presenta la curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar en un rango de concentración de 0 -12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para la determinación de compuestos fenólicos libres totales, la cual presentó buena linealidad, un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.995 y la ecuación de calibración de  $y = 0.0424x - 0.0015$ .

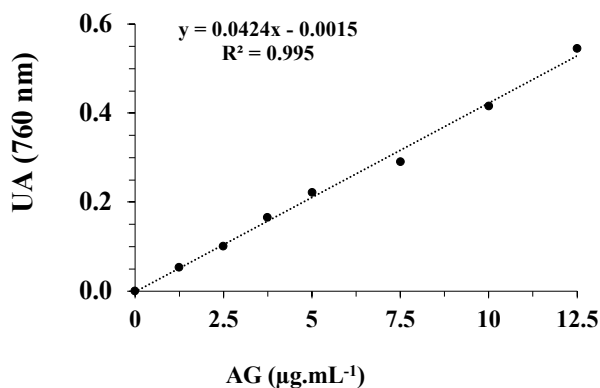


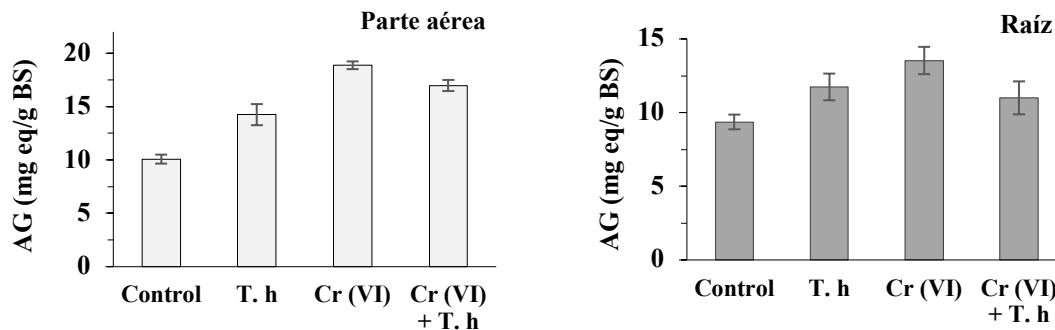
Figura 2. Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos libres totales utilizando ácido gálico como estándar de calibración

En la tabla 1 se presentan los resultados del promedio y sus desviaciones estándar de la determinación de compuestos fenólicos obtenidos en los extractos etanólico en brote y raíz de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y *T. harzianium*. Presentando valores de 1.6 a 3.0  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$  para la parte aérea y de 1.5 a 2.1  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$  para la raíz. En esta tabla se puede apreciar que tanto para la parte aérea (brote) y la raíz de la plántula, existe un incremento en los valores de compuestos fenólicos cuando hay Cr (VI) y/o *T. harzianium*, con respecto al control.

**Tabla 1.** Resultados de la determinación de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium*

Muestra	$\mu\text{g}$ equivalentes de ácido gálico $\text{mL}^{-1}$	
	Parte aérea	Raíz
	Promedio (DE)	Promedio (DE)
Control	1.6 ( $\pm$ 0.01)	1.5 ( $\pm$ 0.08)
<i>T. harzianium</i>	2.2 ( $\pm$ 0.17)	1.7 ( $\pm$ 0.14)
Cr (VI)	3.0 ( $\pm$ 0.14)	2.1 ( $\pm$ 0.06)
<i>T. harzianium</i> + Cr (VI)	2.6 ( $\pm$ 0.10)	1.7 ( $\pm$ 0.19)

En figura 3 se observan los resultados anteriores pero normalizados a mg equivalentes de ácido gálico por gramos de biomasa seca liofilizada (BS). Las muestras presentaron un rango de concentración para la parte aérea 10.1 a 18.9 mg equivalentes de AG  $\text{g}^{-1}$  BS y de 9.4 a 13.5 mg equivalentes de AG  $\text{g}^{-1}$  BS para las raíces. De la comparación del contenido de compuestos fenólicos libres en el extracto de brote de los cuatro tratamientos, se puede observar, una tendencia hacia mayores cantidades de compuestos fenólicos libres en presencia de Cr (VI), en comparación con las plántulas control. También se puede apreciar que la presencia de *T. harzianium* aumenta los niveles de polifenólicos comparado con el control, sin embargo, en presencia de Cr (VI), tiende a disminuirlos en comparación el tratamiento con Cr (VI). Misma tendencia de los resultados se observa en los extractos de raíz.



**Figura 3.** Contenido de compuestos fenólicos libres en extractos etanólicos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium*. La concentración de compuestos fenólicos libres es expresada como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por g de biomasa seca liofilizada (BS) de la parte aérea o raíz.

### Determinación de la capacidad antioxidante

Es bien establecido que los compuestos fenólicos confieren a las plantas propiedades antioxidantes. Debido a que los niveles de estos compuestos varían por las condiciones de exposición de la planta, fue interesante evaluar la capacidad antioxidante en cada uno de los tratamientos. Para ello, se utilizó el ensayo espectrofotométrico del ABTS. El principio de este método consiste en la transferencia de un electrón entre el radical del ABTS $^{\cdot}$  y el antioxidante presente en el medio de la reacción. La capacidad antioxidante se evaluó con base en la disminución de la absorbancia en 735 nm en función de la concentración del antioxidante. La curva de calibración graficando en el eje de las X la concentración de ácido gálico (0 a 1  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ ) y en eje de la Y, los valores de absorbancia obtenidos de la resta del blanco menos el valor de la absorbancia del estándar correspondiente (Abs Bco-Abs std). En la figura 4 se presenta un ejemplo de la



curva de calibración obtenida, observándose buena linealidad, un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9903 y la ecuación de calibración de  $y = 0.1649x - 0.0005$ .

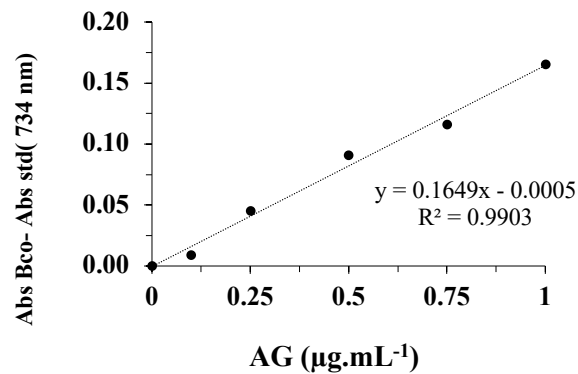


Figura 4. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando ácido gálico como estándar

Los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante (AXO) en los extractos etanólicos de las plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium* son presentados en la tabla 2. Los valores de la concentración se obtuvieron por calibración externa y son promedio de tres repeticiones biológicas para cada tratamiento, los cuales son presentados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$ . Para la parte aérea se obtuvieron valores entre 0.61 a 1.19  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que para raíz la concentración estuvo entre 0.61 a 0.74  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$ . En estos resultados se observa que, de manera similar a los compuestos fenólicos, la presencia de Cr (VI) en el medio de crecimiento estimula el aumento en los niveles de la capacidad antioxidante en la parte aérea de la planta. Interesantemente, la presencia de *T. harzianium* y Cr (VI) inducen la capacidad antioxidante de la planta. Los niveles más bajos fueron encontrados en las plantas control. El mismo efecto se observó cuando las concentraciones fueron normalizadas a la cantidad de biomasa seca liofilizada (figura 5). Por otra parte, en las muestras de los extractos de raíz el efecto de Cr (VI) o *T. harzianium* no fue tan significativo. Los rangos de concentración en las muestras de raíz van de 2.9 a 4.6  $\text{mg}$  equivalentes  $\text{AG g}^{-1}$  de biomasa, siendo el valor más alto cuando esta Cr (VI) y *T. harzianium*, mientras que de la parte aérea presentó valores que van 2.3 a 2.9  $\text{mg}$  equivalentes  $\text{AG g}^{-1}$  de biomasa seca.

**Tabla 2.** Resultados de la determinación de capacidad antioxidante (AXO) evaluado en los extractos etanólicos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium*

Muestra	$\mu\text{g}$ equivalentes de ácido gálico $\text{mL}^{-1}$	
	Parte aérea	Raíz
	Promedio (DE)	Promedio (DE)
Control	0.83 ( $\pm 0.10$ )	0.61 ( $\pm 0.09$ )
<i>T. harzianium</i>	0.84 ( $\pm 0.18$ )	0.68 ( $\pm 0.13$ )
Cr (VI)	1.04 ( $\pm 0.11$ )	0.74 ( $\pm 0.19$ )
<i>T. harzianium</i> + Cr (VI)	1.19 ( $\pm 0.03$ )	0.61 ( $\pm 0.05$ )

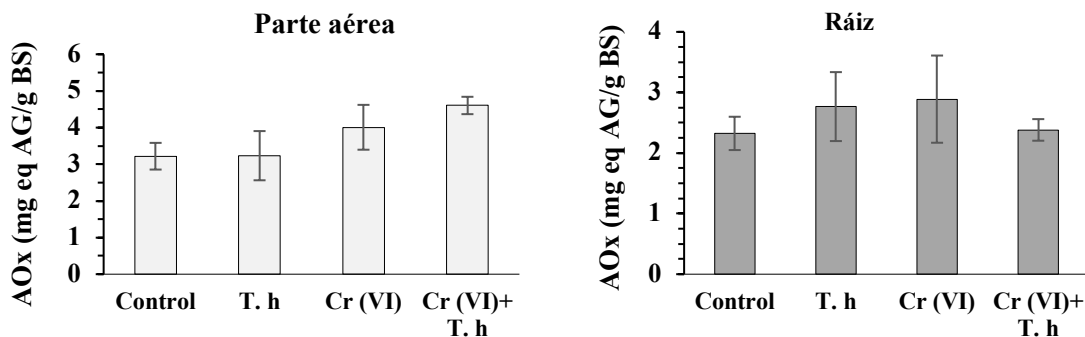


Figura 5. Capacidad en antioxidante (AOX) evaluada extractos etanólicos de plántulas de girasol expuestas a diferentes tratamientos. La concentración es expresada como equivalentes de ácido gálico (AG) por g de biomasa seca liofilizada (BS).

### Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides son una familia de metabolitos secundarios que poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y su contenido en las plantas depende de especie y/o condiciones ambientales. En este trabajo la determinación de flavonoides totales fue realizada por la reacción del extracto etanólico de las plántulas de girasol con  $AlCl_3$ . El principio básico de la reacción de flavonoides con de cloruro aluminio es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en del C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos di hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. La cuantificación de los flavonoides totales en los extractos etanólicos se realizó a partir de calibración de externa. Para la curva de calibración se utilizó como estándar a rutina (quercetin-3-rutinósido) en un rango de concentración de 0 a  $45 \mu g mL^{-1}$ . El gráfico de la curva de calibración es presentado en la figura 6, donde se observa buena linealidad, un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9965 y la ecuación de calibración de  $y = 0.0127x + 0.0102$ .

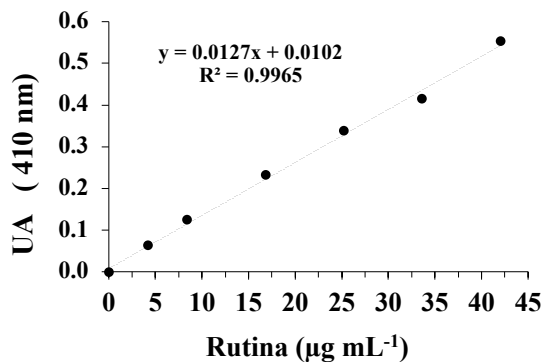


Figura 6. Curva de calibración para la medición de la concentración de flavonoides totales usando rutina como estándar.

En la tabla 3 se presentan los resultados del promedio y sus desviaciones estándar de la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólico de brote y raíz de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y *T. harzianum*. En esta tabla se puede apreciar que para la parte aérea (brote) la concentración está en un rango de 11.3 a  $20.3 \mu g$  equivalentes de rutin  $mL^{-1}$ . Mientras que las muestras de raíz se encuentra entre 6.5 y  $11.5 \mu g$  equivalentes de rutin  $mL^{-1}$ .

**Tabla 3.** Resultados de la determinación de flavonoides totales en muestras de extracto etanólicos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium*.

Muestra	$\mu\text{g}$ equivalentes de rutin $\text{mL}^{-1}$	
	Parte aérea	Raíz
	Promedio (DE)	Promedio (DE)
Control	11.3 ( $\pm$ 2.2)	11.5 ( $\pm$ 0.8)
<i>T. harzianium</i>	15.4 ( $\pm$ 2.0)	13.6 ( $\pm$ 0.4)
Cr (VI)	11.5 ( $\pm$ 1.7)	6.4 ( $\pm$ 0.1)
<i>T. harzianium</i> + Cr (VI)	20.3 ( $\pm$ 1.5)	8.7 ( $\pm$ 0.2)

En la figura 6 se presentan los valores de flavonoides totales normalizados a la cantidad (gramos) de biomasa seca liofilizada. Los rangos de concentración para las muestras de la parte aérea van de 17.4 a 31.3 mg equivalentes de rutina  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca, siendo el valor más alto cuando las plántulas se encuentran en presencia de Cr (VI) y *T. harzianium* (31.3 mg equivalentes de rutina  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca). Para raíz, los rangos de concentración van de 3.4 a 7.3 mg equivalentes de rutina  $\text{g}^{-1}$  de biomasa seca. En este caso, los valores más bajos son por la presencia de Cr (VI) independientemente de la presencia o no de *T. harzianium*.

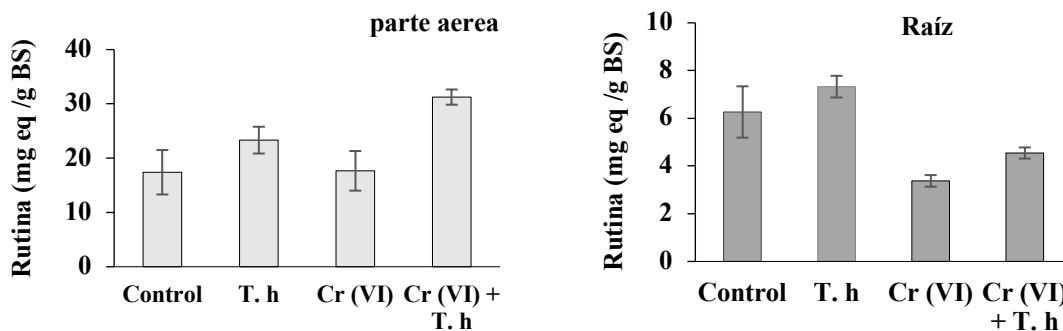


Figura 7. Contenido de flavonoides totales en extractos etanólicos de plántulas de girasol expuestas a estrés por Cr (VI) y/o *T. harzianium*. La concentración de los flavonoides es expresada como mg equivalentes de rutin por g de biomasa seca liofilizada (BS) de la parte aérea o raíz.

## Conclusiones

En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de compuestos polifenólicos totales, capacidad antioxidante y flavonoides totales en extractos etanólicos de liofilizado de plantas por medio de métodos colorimétricos. De acuerdo con las determinaciones de estos metabolitos analizados de extractos etanólicos se observó que:

- Aumento de compuestos fenólicos libres tanto en brote como en raíz cuando las plántulas son expuestas a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr (VI) con respecto al control, sin embargo, la presencia de *T. harzianium* contribuye a su disminución.
- Para la parte aérea, un aumento en la concentración de flavonoides totales cuando las plántulas de girasol son expuestas a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr (VI) y *T. harzianium*, con respecto al control o solo con Cr (VI) o *T. harzianium*. Mientras que para raíz se presenta una disminución cuando las plántulas son expuestas a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr (VI) con respecto al control. Sin embargo, la presencia de *T. harzianium* contribuye a aumentar la cantidad de flavonoides comparado con el control o en presencia de Cr (VI).



- Los resultados obtenidos en este trabajo son un punto de partida para el mejor entendimiento de fitorremediación asistida por microorganismos.

## Agradecimientos

Agradecimientos a la Dirección de Apoyo a la investigación y Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado al proyecto de la convocatoria institucional 2022 con el número 161/2022.

## Referencias

- Atkinson, N. J.; Urwin, P. E., The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany* **2012**, *63* (10), 3523-3543.
- Naikoo, M. I.; Dar, M. I.; Raghib, F.; Jaleel, H.; Ahmad, B.; Raina, A.; Khan, F. A.; Naushin, F., Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules* **2019**, 157-168.
- Kumar, S.; Abedin, M.; Singh, A. K.; Das, S., Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In *Plant phenolics in sustainable agriculture*, Springer: 2020; pp 517-532.
- Raklami, A.; Meddich, A.; Oufdou, K.; Baslam, M., Plants—Microorganisms-Based Bioremediation for Heavy Metal Cleanup: Recent Developments, Phytoremediation Techniques, Regulation Mechanisms, and Molecular Responses. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (9), 5031.
- Shahid, M.; Shamsad, S.; Rafiq, M.; Khalid, S.; Bibi, I.; Niazi, N. K.; Dumat, C.; Rashid, M. I., Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere* **2017**, *178*, 513-533.
- Nguyen, D. T. C.; Nguyen, T. T.; Le, H. T. N.; Nguyen, T. T. T.; Bach, L. G.; Nguyen, T. D.; Vo, D.-V. N.; Van Tran, T., The sunflower plant family for bioenergy, environmental remediation, nanotechnology, medicine, food and agriculture: a review. *Environmental Chemistry Letters* **2021**, *19* (5), 3701-3726.
- Ibarra, A. A. G.; Wrobel, K.; Barrientos, E. Y.; Escobosa, A. R. C.; Corona, J. F. G.; Donis, I. E.; Wrobel, K., Impact of Cr (VI) on the oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Helianthus annuus* roots studied by metabolomic tools. *Chemosphere* **2019**, *220*, 442-451.
- López-Hidalgo, C.; Meijón, M.; Lamelas, L.; Valledor, L. *The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample*; 0140-7791; Wiley Online Library: 2021.
- Magalhães, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L., Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* **2010**, *83* (2), 441-447.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* **1999**, *26* (9-10), 1231-1237.
- Shraim, A. M.; Ahmed, T. A.; Rahman, M. M.; Hijji, Y. M., Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT* **2021**, *150*, 111932.