



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Química

“Estudio analítico para la evaluación del efecto del estrés abiótico en la síntesis de metabolitos con efecto biológico en germinados”

Tesis

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

Presenta

Q. DAVID JEREMIAS MORALES TIRADO

GUANAJUATO, GTO.

Fecha



Contenido

Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	6
Capítulo I. Plántulas y sus potenciales beneficios a la salud.....	7
1.1 Plántulas	7
1.1.1 Pérdida de la dormición de las semillas.....	7
1.2 La germinación.....	8
1.2.1 La imbibición.....	8
1.2.2 Síntesis y activación de los sistemas enzimáticos.....	10
1.2.3 Degradación de las sustancias de reserva.....	11
1.2.4 Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula.....	12
1.3 Afectaciones de la germinación.....	12
1.3.1 Agua.....	12
1.4 Información nutrimental y propiedades de las plántulas.....	13
1.4.1 Introducción.....	13
1.4.2 Información nutricional.....	14
Capítulo II. Hormesis en plantas bajo estrés abiótico.....	16
2.1 Estrés abiótico.....	16
2.2 Hormesis.....	16
2.3 Selenio como un agente estresante que provoca la respuesta bifásica en plantas.....	17
Capítulo III. Ciclitoles como metabolitos secundarios con beneficios en la salud.....	18
3.1 Beneficios a la salud.....	18
3.2 Estructura.....	20
3.3 Formación de ciclitoles.....	21
3.4 Ciclitoles y su afectación bajo estrés abiótico.....	22
3.5 Estado del arte en el análisis de ciclitoles en plántulas y brotes de semillas.....	22
Capítulo IV. Técnicas analíticas utilizadas para el análisis iónico y metabolómico.....	27
4.1 Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES - Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry).....	27
4.2 Cromatografía de Gases.....	27
Capítulo V. Objetivo del Proyecto.....	29
Capítulo VI. Parte experimental.....	30





6.1 Materiales y reactivos.....	30
6.1.1 Equipo de laboratorio	30
6.1.2 Material de laboratorio.....	30
6.1.3 Instrumentación analítica.....	30
6.1.4 Reactivos y estándares	31
6.2 Semillas	31
6.3 Softwares	31
6.4 Condiciones de crecimiento y obtención de biomasa.	32
Capitulo VII. Resultados y discusión.....	35
7.1 Introducción.....	35
7.2 Obtención de plántulas de alfalfa expuestos a diferentes estresantes.....	36
7.3 Determinación de metales mayoritarios y traza en biomasa por MP-AES	38
7.3.1 Resultados de determinación del contenido elemental en biomasa.....	41
7.3.2 Evaluación del factor de captación biológica (BCF).....	42
7.4 Determinación de D-pinitol y myo-inositol mediante GC-MS.	44
7.5 Condiciones de separación cromatográfica y de cuantificación por monitoreo de reacciones múltiples (MRM).....	46
7.6 Calibración	53
7.8 Determinación de ciclitoles en biomasa.....	55
7.9 Integración e interpretación de resultados.....	58
7.9.1 Efecto de Cr (VI).....	58
7.9.2 Efecto de NaCl plántula.....	60
7.9.3 Efecto de Se (IV)	62
8. Conclusiones	68
Referencias.....	70





Indice de figuras

Figura 1. Etapas de germinación de un frijol (https://www.agrosintesis.com/tipos-de-germanizacion/).....	8
Figura 2. Curva de absorción de agua de una semilla. (https://www.google.com/search?q=proceso+de+imbibici%C3%B3n&sxsrf=ALeKk02SyydgypQ0fXB0dVfcgAZD-aAqfw:1621438590733&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiowOa5idbwAhVRAqwKHeCiDd4Q_AUoAXoECAEQAw&biw=767&bih=712).....	9
Figura 3. Representación de los órganos de una semilla. (https://www.sciencefacts.net/parts-of-a-seed.html).	10
Figura 4. Estructura molecular de ciclitoles: A) D-pinitol, B) Bornesitol, C) Scyllo-inositol, D) Myo-inositol y E) D-chiro-inositol.	20
Figura 5. Esquema de biosíntesis de pinitol en plantas. El círculo abierto con una barra representa una reacción que limita la velocidad ⁴⁶	21
Figura 6. Sistema de crecimiento utilizados para la germinación y crecimientos de <i>Medicago sativa</i>	33
Figura 7. Esquema del procedimiento analítico que se llevará a cabo para la evaluación iónico y metabólico.	34
Figura 8. Cantidad de biomasa generada en las diferentes concentraciones de Se (IV) agregados al medio de cultivo.	36
Figura 9. Cantidad de biomasa en las diferentes concentraciones de Cr (VI) y NaCl en el medio de crecimiento	37
Figura 10. Grupos funcionales susceptibles a la derivatizados por reactivos de siliación ³³	44
Figura 11. Esquema de la reacción de derivatización entre un alcohol y BSTFA. R= fragmento molecular D-pinitol y o Myo-inositol.	45
Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto entre un alcohol y derivatizante BSTFA. R= fragmento molecular D-pinitol y o Myo-inositol.	45
Figura 13. Típico cromatograma obtenido en el modo Full Scan de un mix de estándares (-) y un blanco derivatizado (-), A) Resorcinol 7.48 min, B) D-pinitol 8.55 min, C) Myo-inositol 14.03 min y D) resveratrol 18.4 min.	48
Figura 14. Espectro de masas D-pinitol experimental (rojo) y de biblioteca NIST (azul).	48
Figura 15. Espectro de masas myo-inositol experimental (rojo) y de biblioteca NIST (azul).	49
Figura 16. Efecto de la energía de fragmentación sobre abundancia de los iones producto para transiciones de cuatro compuestos de interés.....	50
Figura 17. Cromatogramas MRM de las 8 soluciones de estándar de 0-300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los compuestos D-pinitol y Myo-inositol, así como el estándar interno resorcinol en 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	53
Figura 18. Acercamiento de las secciones de cromatogramas presentados en la Fig. 17, correspondientes a señales de D-pinitol (11.85 min) y Myo-inositol (14.02) min; concentraciones de ambos analitos 30-300 $\mu\text{g L}^{-1}$	54
Figura 19. Cromatograma MRM de una muestra real - plántulas crecidas en exposición a 10 mg L^{-1} de Na en el medio.	56
Figura 20. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Cr (VI) sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.....	58
Figura 21. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de Cr (VI).	59
Figura 22. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de NaCl sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.....	60
Figura 23. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de NaCl.....	61
Figura 24. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Se (IV) sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.....	62





Figura 25. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de Se (IV). 63

Figura 26. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con selenito. 64

Figura 27. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con cloruro de sodio. 64

Figura 28. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con dicromato. 64





Índice de tablas

- Tabla 1. porcentaje de humedad requerido por semillas para una buena germinación. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 2. Ciclitoles y sus potenciales beneficios a la salud. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3. Composición de medio Hoagland modificado..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4. Concentraciones en medio de crecimiento de cada agente estresante. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 5. Condiciones óptimas para la generación de hidruros durante el análisis de selenio. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 6. Parámetros instrumentales del equipo MP-AES para la determinación de elementos mayoritarios, minoritarios y Cr respectivamente en biomasa y medio de cultivo. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 7. Parámetros instrumentales del equipo MP-AES para la determinación de selenio en biomasa. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 8. Funciones de calibración obtenidas para cada longitud de onda seleccionada. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 9. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de la determinación de elementos en el material de referencia NIST 1572..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 10. Factor de captación biológica para cada condición estresante NaCl y Cr de los medios de cultivo ($\text{mg g}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 11. Factor de captación biológica para la condición de Se en los brotes de alfalfa ($\text{mg g}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$). **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 12. Niveles de concentración elemental encontrados en alfalfa expuesta a las distintas condiciones de estrés Cr (VI), NaCl y Se (IV)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 13. Concentración de Cr obtenida en biomasa tras someter los cultivos de alfalfa a dicromato de potasio en el medio de cultivo..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 14. Concentración de Se obtenida en biomasa tras someter los cultivos de alfalfa a selenito en el medio de cultivo. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 15. parámetros instrumentales de GC-MS para la determinación de D-pinitol y Myo-inositol. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 16. Iones precursores y producto seleccionados para cada analito..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 17. Compuesto, masa molecular, iones precursores y iones producto (cualificador (Q) y cuantificador (C) con su respectiva energía de ruptura. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 18. Condiciones instrumentales para MRM seccionado en segmentos estructurales y sus respectivos tiempos de retención y su DE..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 19. Analitos, función de calibración, valores de m/z para los iones precursores (IP) y iones producto (Ip) y los valores de energías de colisión, para cada caso se obtuvieron dos transiciones, una para el ion cuantificador (C) y otra para el ion calificador (Q)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 20. Niveles de concentración de D-pinitol y Myo inositol en plántulas de alfalfa expuesta a diferentes concentraciones de Cr (VI), NaCl y Se (IV). **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 21. Porcentajes de recuperación de D-pinitol, los análisis son de duplicados analíticos a los cuales se les adiciono 2.5 μg de estándar D-pinitol..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 22. Efectos biológicos reportados sobre **¡Error! Marcador no definido.**





Capítulo I. Plántulas y sus potenciales beneficios a la salud.

1.1 Plántulas

Desde la antigüedad en Asia se mencionaba la ingesta de brotes con el objetivo de que se podría lograr una etapa de vida en las personas de 100 años, no solamente se recomendaba en el contexto de longevidad, si no también, se recomendaba para prevenir diversas enfermedades. En ese entonces ya se sabía que el consumo de los brotes aportaba al organismo una incalculable cantidad de nutrientes (hoy en día se habla de biomoléculas, enzimas y metabolitos) que se generan en el desarrollo de la nueva plántula ¹.

El proceso de germinación consta de una serie de etapas en las que el grano que será brote sufre una serie de cambios metamórficos que definirán la evolución de la semilla.

1.1.1 Pérdida de la dormición de las semillas

La señalización durante pérdida de la dormición en las semillas se relaciona con los niveles de fitohormonas: ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs) presentes en la semilla dormida. Por otro lado, no se ha demostrado que una proteína concreta esté involucrada en la inducción de la germinación en las semillas dormidas. Tampoco se ha encontrado alguna relación de este proceso con la respiración.

Las semillas maduras almacenadas en seco y a temperatura ambiente durante varios meses (after-ripening) pierden la dormición primaria bajo ciertas condiciones. Algunas alteraciones producto del after-ripening que pueden inducir pérdida de dormición e inicio de germinación son: ligero aumento de temperatura, descenso de la sensibilidad del ABA y de la concentración de este, el aumento de la sensibilidad a las GAs, humedad.² Cabe señalar que ABA es acumulada en el embrión y le confiere la resistencia a desecación durante dormición mientras que la pérdida de dormición se relaciona con disminución del contenido del ABA mediante su catabolismo. Al mismo tiempo, ocurre el aumento de los niveles de GAs, que son las fitohormonas necesarias para crecimiento.



1.2 La germinación.

La germinación es un conjunto de procesos por los cuales el embrión, el cual, se encuentra en estado de vida latente dentro de la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula (figura 1³).

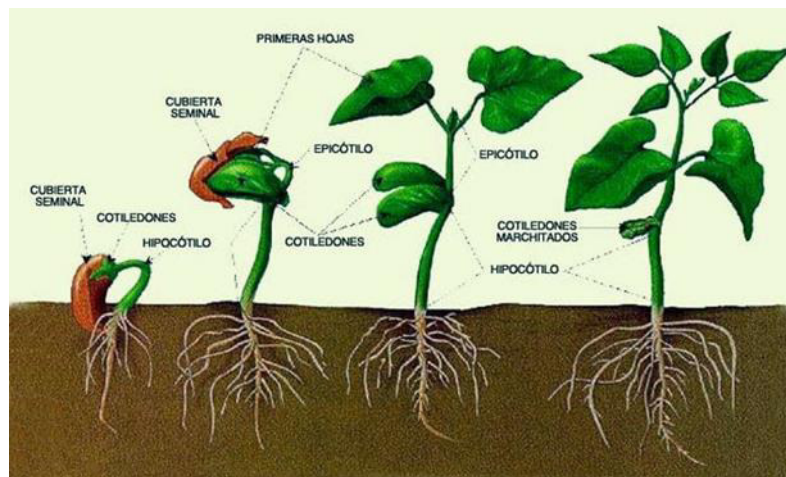


Figura 1. Etapas de germinación de un frijol (<https://www.agrosintesis.com/tipos-de-germanizacion/>)

Para que la germinación de una semilla se cumpla deben cumplirse tres condiciones: que el embrión sea viable (que se encuentre vivo), que los factores externos sean favorables y que no se presenten alteraciones internas que impidan la germinación³.

La germinación comprende cuatro etapas principales:

1. La imbibición de agua.
2. Síntesis y activación de los sistemas enzimáticos.
3. Degradación/utilización de las sustancias de reserva.
4. Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula³.

1.2.1 La imbibición.

En el suelo húmedo, donde exista un gradiente pronunciado del contenido de agua respecto a la semilla, el agua penetra a la semilla; a este fenómeno de entrada de agua se denomina imbibición, siendo únicamente un proceso físico. La cantidad del agua que entra a la semilla depende de las especies vegetales; por ejemplo, en los cereales dicha cantidad corresponde un 40%-60% del peso de la semilla seca, mientras que en las leguminosas asciende hasta al 180%. La cantidad de agua que es absorbida por las distintas especies depende del tipo de sustancias de reserva que contengan, siendo aquellas con endospermo amiláceo las que presentan una hidratación menor en comparación con las que presentan un endospermo proteico altamente hidratable.

El agua se introduce a través de los tegumentos, el micropilo, el estróbilo, por las paredes y las membranas celulares, uniéndose por puentes de hidrógeno a los coloides e interactuando con la



especie en forma de iones al inicio de la imbibición, el ingreso de agua es rápido y es aquí donde las macromoléculas y las estructuras de las semillas se rehidratan y recuperan sus formas funcionales.

El proceso de imbibición se divide en tres etapas: fase I rápida, fase II meseta y fase III elongación del embrión o radícula, como se observa en la figura 2³.

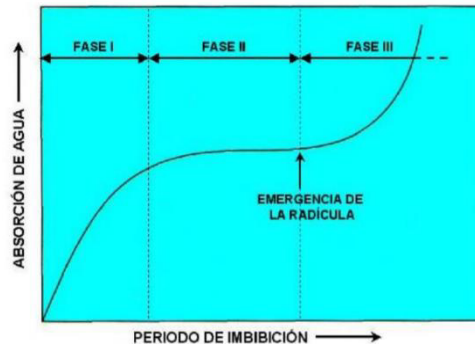


Figura 2. Curva de absorción de agua de una semilla.

(https://www.google.com/search?q=proceso+de+imbibici%C3%B3n&sxsrf=ALeKk02SydygypQ0fXB0dVfcgAZD-aAqfw:1621438590733&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiowOa5idbwAhVRAqwKHeCiDd4Q_AUoAXoECAEQAw&biw=767&bih=712)

El periodo de duración entre las fases es dependiente de las características de la semilla (tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de oxígeno). De manera paralela a la imbibición se reactiva la actividad respiratoria en la semilla.

La tasa de imbibición varía por efecto de diversos factores que determinan la respuesta en la germinación de las semillas, tales son:

- a) Concentración de sales en el agua.

A imbibición es mucho más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que no contiene electrolitos. El principio por el cual se explica es el de presión de difusión del agua. De esta aparte se entiende que las semillas absorben agua lentamente en suelos secos o salinos. No solo porque existe una menor cantidad de agua, también es causa de una menor presión de difusión del agua.

- b) Temperatura.

Cuando la temperatura del agua que está en contacto con la semilla es elevada, aumenta la tasa de absorción de agua, un aumento de 10 °C en la temperatura del agua duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de imbibición.

- c) Presión hidrostática. Presión hidrostática.

Al momento que el agua se introduce en la semilla, se provoca un aumento de volumen y de la presión en las membranas celulares. Las membranas celulares oponen resistencia, lo que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión afuera y por ello una disminución de la tasa de absorción por parte de la semilla.

- d) Área de la semilla en contacto con agua.



La tasa de absorción de agua por parte de la semilla es proporcional a la magnitud del área de la semilla que está en contacto con el agua.

e) Fuerzas intermoleculares.

Fuerzas de naturaleza eléctrica y cualquier aumento en estas fuerzas ocasiona una disminución de la presión de difusión del agua y por ello la tasa de absorción de las semillas. Estas fuerzas se evidencian más en los suelos. Suelos de bajo contenido de agua sujeta la humedad mediante fuerzas intermoleculares.

f) Absorción por los órganos de la semilla.

Las semillas están compuestas por diversos órganos (figura 3), los cuales se pueden agrupar en categorías:

1. Cubierta seminal (testa, pericarpio, etc.).
2. Tejidos nutritivos de reserva (cotiledones, endospermo, perispermo, etc.)
3. Eje embrionario (compuesto de radícula, plúmula y estructuras asociadas).

Estos órganos absorben agua a diferentes velocidades y magnitudes.³

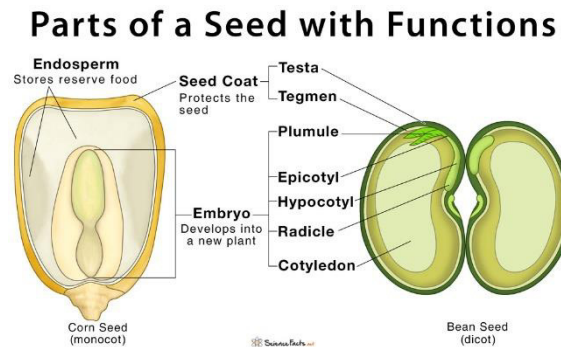


Figura 3. Representación de los órganos de una semilla. (<https://www.sciencefacts.net/parts-of-a-seed.html>).

1.2.2 Síntesis y activación de los sistemas enzimáticos.

Es aquí donde ocurre la emergencia radicular, donde el eje embrionario atraviesa los tejidos que lo envuelven y comienzan un metabolismo aerobio, dejando de lado el metabolismo anaerobio y con esto, finaliza la germinación y da el inicio del crecimiento de la plántula. El proceso de germinación está conducido principalmente por la elongación celular, y que, además, suele acompañarse por actividad mitótica. Al momento también coexiste un crecimiento radicular a la par de la elongación, este crecimiento radicular se debe por un ablandamiento de la pared celular y por efecto de la presión de turgencia de las células que se encuentran en la región sub apical comúnmente llamado **zona de elongación**. La señal que induce el inicio de la elongación y el mecanismo subyacente a un no se conocen, aunque se han propuesto tres posibles vías:

- Acumulación osmótica de solutos ocasionando el incremento de la presión de turgencia.
- Aumento de la extensibilidad de las paredes celulares, previo al inicio de la elongación.
- Acción conjunta de los tejidos que rodean la pared celular.





Para la primera de las vías, aún no se hallan pruebas concretas que demuestren cambio del potencial osmótico de la zona sub-apical durante la germinación. La segunda ruta, podría implicar la actividad del xiloglucano, así como la actividad de las expansinas, pero hasta el momento, no se han encontrado ninguna de las dos proteínas antes mencionadas en las semillas en germinación. No obstante, ambas proteínas son estimuladas por AIA con la última vía se sabe que se relación con aquellas semillas que cuentan con la radícula comprimida por los tejidos que la rodean (endospermo, perispermo). Existen una variedad de enzimas que se relacionan con este proceso de relajación: endo- β -mananasa, β -manosidasa, celulasa y $\beta_{1, 3}$ -glucanasa. Este proceso de emergencia radicular se puede inhibir por ABA y otros compuestos (derivado cumáricos y fenólicos)⁴.

1.2.3 Degradación de las sustancias de reserva.

Durante el desarrollo de las semillas se tiene un almacenamiento de sustancias de reserva en los cotiledones y el endospermo, sustancias que tienen la misión de alimentar a la plántula hasta el momento en que pueda desarrollar procesos fotosintéticos y lograr ser un organismo autótrofo. Estas sustancias deben ser hidrolizadas para lograr formar parte del metabolismo heterotrófico de la plántula. Las sustancias previamente hidrolizadas podrán ser conducidas desde los órganos de reserva a los órganos de crecimiento activos a través de rutas celulares correspondientes.

Las rutas de movilización de las sustancias se llevan a cabo en monocotiledóneas, particularmente gramíneas. Siendo estas partes de semillas donde el proceso se controla por el embrión, ya que una ausencia del embrión impide que exista una degradación del endospermo. En hidrolisis de compuestos de reserva, el papel importante juega fitohormonas GAs. Estas hormonas inducen la síntesis y la posterior secreción hacia el endospermo de la α -amilasa para iniciar la degradación del almidón, aunque esta acción se inhibe por acción de las ABA. No obstante, no solo la α -amilasa está implicada, también se ven involucradas las GAs en la síntesis de otras enzimas hidrolíticas. Los genes activados por las GAs se pueden inhibir por efecto de las ABA.

Las GAs se hallan implicadas en el buen funcionamiento de las secreciones enzimáticas de las células aleuronares por efecto de una elevación de los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, el cual es necesario en el proceso de exocitosis. Por otro lado, las enzimas que hidrolizan el almidón y las proteínas en el endospermo de los cereales se activan en condiciones ligeramente acidas, condición que existe en el endospermo durante la imbibición de la semilla, debido a la alta concentración de ácido málico. Sin embargo, aunque el contenido de ácido málico desciende con la germinación, el pH se mantiene ácido por efecto de las GAs ya que estas propician a entrada de ácido fosfórico y cítrico desde las capas aleuronares.

Las reservas de fosfatos en forma de fitina y/o fitato sirven como fuente de fósforo – uno de los importantes macronutrientes. La fitasa abunda en las células aleuronares de las semillas secas en suficiente cantidad para hidrolizar las reservas de fitina o fitato, ya que produce precursores de componentes estructurales de la pared celular primaria, tales como: fosfato y mioniositol.

Degradación de las proteínas de reserva en las semillas de monocotiledóneas, también se inicia como consecuencia de la proteólisis en las células aleuronares. Tales células pueden liberar enzimas proteolíticas (endo- y exopeptidasas) al endospermo. No obstante, otras enzimas son





sintetizadas en la embriogénesis y almacenadas en la semilla seca de tal forma que no se produzca una degradación de las proteínas solubles. La actividad enzimática de las endopeptidasas y exopeptidasas aumenta a medida que avanza la imbibición. Existen casos en los cuales aún se siguen incrementando una vez que se finalice la germinación.

Como productos de la degradación de sustancias de reserva lipídicas (principalmente triglicéridos), durante germinación se forman ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos sirven como precursores de azúcares que son sintetizados en el citoplasma. Las enzimas participantes en la degradación de lípidos pertenecen a las familias de lipasas y glioxisomas. La degradación de los lípidos de reserva por el eje embrionario no se ha demostrado^{3,4}.

1.2.4 Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula.

En el final de la fase III de la germinación, el embrión dispone de nutrientes para crecer convirtiéndose en una plántula. Aquí todos los productos de la hidrólisis nutren al embrión y este inicia su crecimiento para ser una plántula heterótrofa y sus procesos de fotosíntesis.³

1.3 Afectaciones de la germinación.

Principalmente hay dos tipos de factores que afectan el proceso de germinación de semillas: factores externos e internos.

a) Factores externos.

Son determinados por el ambiente en el que ocurre la germinación e incluyen a disponibilidad del agua, composición de gases, temperatura y acceso de la luz. Estos factores pueden ser controlados relativamente fácil.

b) Factores internos.

Son propios de la semilla y deciden sobre viabilidad de la semilla, entre ellos se pueden mencionar: grado de madurez de embriones, presencia y cantidad de inhibidores, tegumentos duros, longevidad de la semilla, presencia de fitocromos, embriones rudimentarios y embriones anatómicamente inmaduros³.

1.3.1 Agua.

Ya se ha descrito antes que la germinación comienza por la etapa de imbibición y que cada especie vegetal requiere de un porcentaje de humedad para que pueda germinar.

Las semillas con alto contenido de proteína necesitan mayor cantidad de agua comparando con las semillas con bajos niveles de proteína³.

Tabla 1. porcentaje de humedad requerido por semillas para una buena germinación.

Cultivo	Contenido de headed %
Maoz (Zea mays)	30.5
Soya (Glycine max)	50.0
Gremolata (Beta ssp.)	31.0
Algo don (Gossypium ssp.)	50.0-55.0
Hlguerilla (Ricinus comunis)	32.0-36.0





Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	32.0-35.0
Avenal (<i>Avena sativa</i>)	32.0-36.0
Mani (<i>Arachis Hypogaea</i>)	50.0-55.0

1.4 Información nutrimental y propiedades de las plántulas.

1.4.1 Introducción.

Debido a los procesos que ocurren durante germinación, el valor nutritivo de las plántulas es de suma importancia en la nutrición humana. De hecho, las plántulas de cereales han estado presentes en la dieta humana de antaño, aunque en la actualidad el interés en plántulas se ha expandido a otros tipos de plantas (frutales, hierbas, especias, vegetales frescos, etc.)⁵. En cuanto a cereales, el contenido nutricional y energético almacenado en semillas es muy alto y sus plántulas proveen directamente productos de hidrólisis enzimática de proteínas, lípidos y azúcares haciendo más fácil su asimilación y utilización en el organismo humano. En este contexto, las semillas de cereales o leguminosas son un alimento adecuado para estómagos delicados. Aunado a ello, las plántulas de cereales y de otras plantas se consideran fuentes ricas en minerales, vitaminas, antioxidantes y otros productos de metabolismo secundario potencialmente benéficos para los humanos⁶.

Para la comercialización de plántulas, se consideran productos que contengan todo el salvado, germen y el endospermo además del brote en crecimiento que no exceda la longitud del grano. Siendo así, se nombran granos integrales, malteados o plántulas. El tiempo que se utiliza para producir las plántulas son de una a tres semanas, dependiendo del tipo de la planta y de las condiciones empleadas durante el proceso⁷. Las plántulas se cultivan y conservan de manera fácil y en cualquier época del año, lo que los convierte en una opción económicamente viable.⁸ Finalmente, una ventaja adicional es que el brote se puede ingerir entero y crudo, incluyendo raíces y hojas. El tiempo que se utiliza para las plántulas se demoran entre 1-3 semanas dependiendo del interés⁹.

Las plántulas se cultivan y conservan de manera fácil y en cualquier época del año, lo que convierte las plántulas en una opción económicamente viable¹⁰.

El brote se puede ingerir entero y crudo, incluyendo raíces y hojas.

Relacionando los procesos de degradación de reservas almacenadas en semillas durante el proceso de germinación con el valor nutritivo de las plántulas, hay que mencionar los siguientes aspectos:

- Las proteínas se transforman en péptidos y aminoácidos fácilmente asimilados en el tracto digestivo del ser humano.
- El almidón se reduce a maltosa y dextrina, los cuales son azúcares más simples y, por lo tanto, exigen menos gasto energético para el aparato digestivo, son una fuente de energía más rápida.
- Se generan abundantes vitaminas.
- Las grasas pasan a formar ácidos grasos también más asimilables respecto a triglicéridos.
- Multiplicación de vitaminas C y E y minerales: calcio, fósforo, hierro, potasio y magnesio.





- f) Se forma clorofila importante antioxidante con demostrados beneficios para salud humana.
- g) Se eliminan los ácidos y las toxinas que acompañan a la semilla.¹⁰

1.4.2 Información nutricional.

1.4.2.1 Aminoácidos esenciales.

Las plántulas de leguminosas son una excelente fuente de aminoácidos esenciales por lo que son ideales para complementar la dieta.

De los 21 aminoácidos que son combinados para formar proteínas en el organismo humano, solo algunos pueden ser sintetizados por el mismo organismo, siendo estos: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina. En cambio, existe otro grupo denominado aminoácidos esenciales, los cuales, deben ser ingresados al organismo junto con alimentos y estos son: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina¹¹.

1.4.2.2 Vitamina C.

Las plántulas también son una fuente de ácido ascórbico, el cual actúa como un potente antioxidante, protegiendo células de los daños causados por radicales libres formados excesivamente en estados de estrés.

1.4.2.3 Betacarotenos.

Los antioxidantes son sustancias que previenen o retardan daño oxidativo, una excelente fuente de antioxidantes son las plántulas. Específicamente, las plántulas proveen los betacarotenos los cuales son precursores de vitamina A y, además, protegen contra la actividad de los radicales libres¹².

1.4.2.4 Vitamina B.

El complejo B está conformado por ocho vitaminas importantes para el desarrollo del organismo y sus funciones; las plántulas se consideran muy buena fuente de B1, B2 y B3, los cuales son abundantes específicamente en alfalfa, trigo y girasol. Estas vitaminas contribuyen al buen funcionamiento del sistema nervioso¹³.

1.4.2.5 Vitamina K.

Entre los complejos vitamínicos que contienen las plántulas también existen la vitamina K que tiene un papel importante para la coagulación de sangre y salud de los huesos.¹⁴

1.4.2.6 Clorofila.

Como todas las plantas, también las plántulas contienen clorofila, a la cual se le asocian diversas funciones en el organismo.

- a) Previene el ataque de sustancias cancerígenas.
- b) Detoxifica el organismo y sangre.
- c) Combate anemia.
- d) Estimula el sistema inmunológico.





e) Normalizar la presión arterial¹⁵.

1.4.2.7 Micronutrientes Minerales.

a) Calcio.

Mineral indispensable para varios procesos del organismo como la formación de los huesos y los dientes, contracción muscular y el funcionamiento del sistema nervioso. Ayuda en la coagulación de la sangre y en la actividad enzimática¹⁶.

b) Potasio.

Mineral hallado en muchos alimentos. Necesario para el buen funcionamiento del riñón y corazón, además de la transmisión nerviosa, entre otras muchas funciones¹⁷.

c) Hierro.

El hierro es necesario para el crecimiento y desarrollo del cuerpo, utilizado para fabricar hemoglobina y mioglobina, elaboración de hormonas y tejido conectivo¹⁸.

d) Oligoelementos.

Se define oligoelemento a aquel que representa menos del 0.01% de la masa corporal o aquel cuyo contenido en el plasma es menor a 100 mg/L.

La deficiencia de un oligoelemento puede dar lugar a una actividad reducida en los sistemas enzimáticos hormonales que dependen de él, lo que conllevará a una diversidad de anomalías bioquímicas y funcionales¹⁹.





Capítulo II. Hormesis en plantas bajo estrés abiótico.

2.1 Estrés abiótico.

El estado de estrés se define como la reacción del organismo a los factores externos que amenazan su funcionamiento normal. En plantas, el estrés biótico es provocado por seres vivos, mientras que el estrés abiótico es producido por agentes tales como plaguicidas, metales pesados, cambios en la salinidad, altas y bajas temperaturas, alta intensidad de luz o sequía. Es importante mencionar que, la escasez o exposición a excesivas concentraciones de micronutrientes minerales y/o fertilizantes también provoca estrés en las plantas. Las plantas responden a estrés mediante diversos mecanismos de defensa y/o tolerancia; de hecho, estos organismos por lo general tienen gran capacidad de adaptación ya que no pueden trasladarse y dependen de materia prima que se encuentre a su alrededor. Cualquier tipo de estrés activa diferentes rutas de señalización que desencadenan los mecanismos de defensa en la planta. Las llamadas especies oxígeno reactivas (ROS) juegan papel central en esta señalización a través de su efecto sobre síntesis y actividad de diferentes enzimas y hormonas vegetales y también a nivel de homeostasis redox, metabolismo de calcio, metabolismo secundario, entre otras. La comprensión de todos estos procesos es importante, ya que ayudaría a desarrollar nuevas estrategias para producir plantas en condiciones ambientales severas o bajo exposición a ciertos agentes de estrés²⁰. Específicamente, existe el interés en estudio de metabolitos secundarios no sólo para contribuir en la elucidación de los mecanismos de protección y mantenimiento de la homeostasis, sino también por sus aplicaciones en el campo de la salud, agricultura y alimentos. Entre los más estudiados metabolitos secundarios se encuentran los compuestos fenólicos (fenoles, ácidos benzoicos, fenilpropanoides, y flavonoides) que principalmente contribuyen a mantener el equilibrio redox dentro de las plantas debido a su capacidad de quelar metales o interactuar directamente con radicales libres; así mismo, para este tipo de compuestos, se han reportado efectos biológicos benéficos para la salud del ser humano como la actividad antioxidante, quimiopreventiva, antiinflamatoria y antimicrobiana.²¹ Cabe mencionar que la producción de metabolitos secundarios depende de la especie de planta, el tipo y condición del agente estresante, periodo del estrés y etapa de crecimiento.

2.2 Hormesis.

Al someter las plantas a estrés abiótico, éstas usualmente presentan respuestas bifásicas y es la concentración del agente estresante la que juega un papel importante. La exposición de la planta a bajas y/o moderadas concentraciones del estresor resulta en la efectiva defensa, observándose un mejor crecimiento, un mejor estatus de nutrientes y, a menudo, incremento de la síntesis de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes u otras propiedades benéficas tanto para la planta como también para los que la consumen. Por otro lado, las concentraciones excesivas de los agentes estresantes inevitablemente provocan efectos adversos en la planta, sobrepasando su capacidad de defensa hasta ocasionar la muerte celular. Esta respuesta bifásica se asocia con el término de hormesis utilizado en toxicología. Específicamente, la hormesis es un fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación en dosis bajas y una inhibición para dosis altas, que resulta en una curva de respuesta en forma de U invertida.²²





La respuesta bifásica ocurre también a nivel de germinación, como se demostró para *Lepidium sativum* bajo estrés de metales pesados²³ o *Lolium rigidum* bajo diferentes tipos de estrés ambiental²⁴. En este contexto, para producir las plántulas de buena calidad, con alto valor nutritivo, se deben entender los mecanismos de respuesta en esta etapa del desarrollo de la planta y emplear las dosis adecuadas de diferentes estímulos o agentes de estrés.

2.3 Selenio como un agente estresante que provoca la respuesta bifásica en plantas

El selenio es un elemento con múltiples efectos benéficos en plantas, como lo demuestran numerosos estudios realizados a lo largo de décadas²⁵⁻²⁷, incluyendo algunas aportaciones de nuestro grupo de trabajo^{26,28-30}. La respuesta a Se en plantas se ajusta a modelo bifásico de tal manera que bajas concentraciones estimulan el crecimiento, aumentan la actividad antioxidante y la producción de metabolitos secundarios (por ejemplo, del grupo de los fenoles). Por su parte, altas concentraciones inhiben el crecimiento, la fotosíntesis y ejercen efectos tóxicos a nivel celular²⁷. Adicionalmente, el enriquecimiento *in vivo* de las plantas con Se resulta en biotransformación de sus formas inorgánicas a especies orgánicas con demostrada actividad antioxidante y anticancerígena, siendo las más importantes de estas especies Se-metilcisteína y gamma-glutamil Se-metilcisteína. Es por ello por lo que, plántulas y brotes de plantas comestibles crecidas en presencia de Se inorgánico, se han considerado como alimentos funcionales que contienen Se-metabolitos con actividad biológica además de cantidades incrementadas de nutrientes, metabolitos secundarios y de algunos micronutrientes minerales³¹. En cuanto a estos últimos, existen evidencias que la exposición a Se (IV) afecta el tráfico de iones metálicos; como ejemplo se ha observado la mejor captación Mn, Ni, Zn, Na y K en plántulas de alfalfa bajo exposición a Se (IV)³².

En el presente trabajo de tesis se pretende establecer las condiciones de exposición a Se (IV) que aseguren la mejor posible composición de plántulas desde el punto de vista de su valor nutricional. En base a los resultados previos, se ha seleccionado como modelo de estudio a las plántulas de *Medicago sativa* (alfalfa), debido a su naturalmente alto valor nutricional atribuido a composición en carbohidratos, proteínas y minerales, además de ser una fuente de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, saponinas, sapogeninas, ciclitoles y trigonelina. Aunado a lo anterior, la selección de este sistema biológico se hizo con base en los parámetros observados en estudios previos realizados por el equipo de trabajo³³, tales como: rápida germinación, fácil accesibilidad a las semillas, crecimiento en sistemas hidropónicos, periodos cortos de germinación, más del 70% de conversión de selenio inorgánico (iSe) a selenio orgánico (oSe), tolerancia a soportar concentraciones de hasta 10 mg Se L⁻¹ en medio y aumento en la captación de elementos esenciales como Cu, Mn, Mo, Ca y K cuando la planta es expuesta a bajas concentraciones de Se (IV)³⁴.

Para lograr una mejor comprensión del efecto de Se (IV) sobre composición de los plántulas de la alfalfa, se propone comparar la respuesta de plántulas a diferentes concentraciones de Se (IV) y además utilizar otros dos agentes estresantes para los cuales no se esperan efectos benéficos, es decir Cr (VI) y NaCl.





Capitulo III. Ciclitoles como metabolitos secundarios con beneficios en la salud.

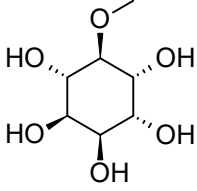
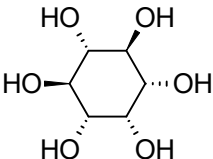
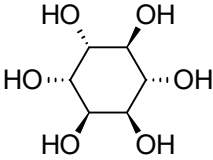
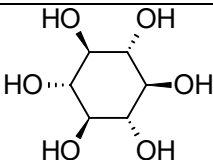
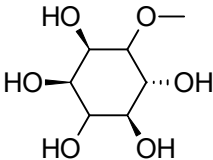
Uno de los enfoques del trabajo de tesis es la evaluación comparativa del impacto que podría tener la exposición de plántulas a Se (IV), Cr (VI) o NaCl sobre los niveles de ciclitoles en plántulas de alfalfa. Como antecedente, se deben mencionar un estudio metabolómico no-dirigido realizado anteriormente en el grupo de trabajo para evaluar comparativamente los perfiles metabolómicos de los brotes de alfalfa crecidos con Se (IV) respecto a los controles.³⁵ Para ello, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); encontrándose cambio de niveles de D-pinitol que dependieron de la concentración de Se (IV) en el medio. Específicamente, plántulas obtenidas en presencia de bajas concentraciones de Se (IV) (0.5 y 1.0 mgSe L⁻¹) presentaron mayores abundancias de este metabolito respecto a las plántulas controles, no expuestas a Se (IV). La presencia de pinitol en alfalfa ya ha sido reportada, así como el efecto del estrés abiótico (inducido por la presencia de metales, sequía y salinidad en el suelo) sobre la síntesis de este compuesto. En concreto, se ha encontrado que durante el incremento en la síntesis de D-pinitol está involucrada la expresión de ciertos genes en diversos tejidos vegetales durante estrés por sequía.²⁹ A pesar de estos estudios previos, el efecto de la presencia de Se (IV) en el medio de crecimiento sobre producción de D-pinitol no ha sido explorado aún.

3.1 Beneficios a la salud.

La importancia del estudio enfocado en el aumento de abundancia de pinitol en plántulas se sustenta en múltiples efectos benéficos reportados para este metabolito en el organismo humano. Específicamente, los derivados de mioinositol están involucrados en los procesos de regulación celular, transducción de señales, osmorregulación, fisiología de los canales iónicos, además, son componentes de la membrana celular. Aunado a esto, existen evidencias que la ingesta de ciclitoles puede mejorar el metabolismo de ciertos fármacos.



Tabla 2. Ciclitolos y sus potenciales beneficios a la salud.

Ciclitol	Beneficios	Referencia
 <p>D-pinitol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción y ataque hacia células cancerígenas de próstata. • Insulinomimético • Preventivo de estrés oxidativo • Hepatoprotectivo • Inmuno-supresor • Anti-osteoporosis 	36
 <p>Myo-inositol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de sensibilización a la insulina • Mejora la resistencia a la insulina • Reductor de riesgos cardiovasculares • Estimulación de la menstruación y la ovulación en el síndrome de ovario poliquístico • Mejoramiento de la osteogénesis • Aumento de la concentración cerebral 	37 38 38 39
 <p>D-chiro-inositol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento en diabetes tipo 2 • Hipoglucémico • Hipocolesterico • Mejoramiento de la Resistencia a la insulina • Inhibición de osteoclastos • Sintetizador de insulina 	39 40
 <p>Scyllo-inositol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer • Tratamiento de ovario poliquístico • Disminución del riesgo de contraer diabetes mellitus 	41 42
 <p>Bornesitol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antihipertensivo • Inhibe de la formación de osteoclastos 	43 44



3.2 Estructura.

Los ciclitoles son un grupo de compuestos cíclicos polioles y son metabolitos naturales, abundantes en plantas. Los ciclitoles son estructuralmente cicloalcanos que contienen un grupo hidroxilo al menos en cada átomo del anillo. También son llamados alcoholes de azúcar. En la figura 4 se presentan estructuras de principales ciclitoles reportados en plantas. Estos compuestos son altamente solubles en agua y no son reactivos en el ambiente celular, por lo que pueden ser acumulados hasta las concentraciones altas sin interactuar con estructuras celulares ni interferir en el metabolismo primario. Myo-inositol es utilizado como sustrato en la producción y acumulación de los derivados metilados, entre los cuales el más estudiado es pinitol; de hecho, en algunas plantas pinitol es el más abundante derivado de sucrosa.

Los ciclitoles son estructuralmente cicloalcanos que contienen un grupo hidroxilo al menos en cada átomo del anillo. La estructura de los ciclitoles se muestran en la figura 4.

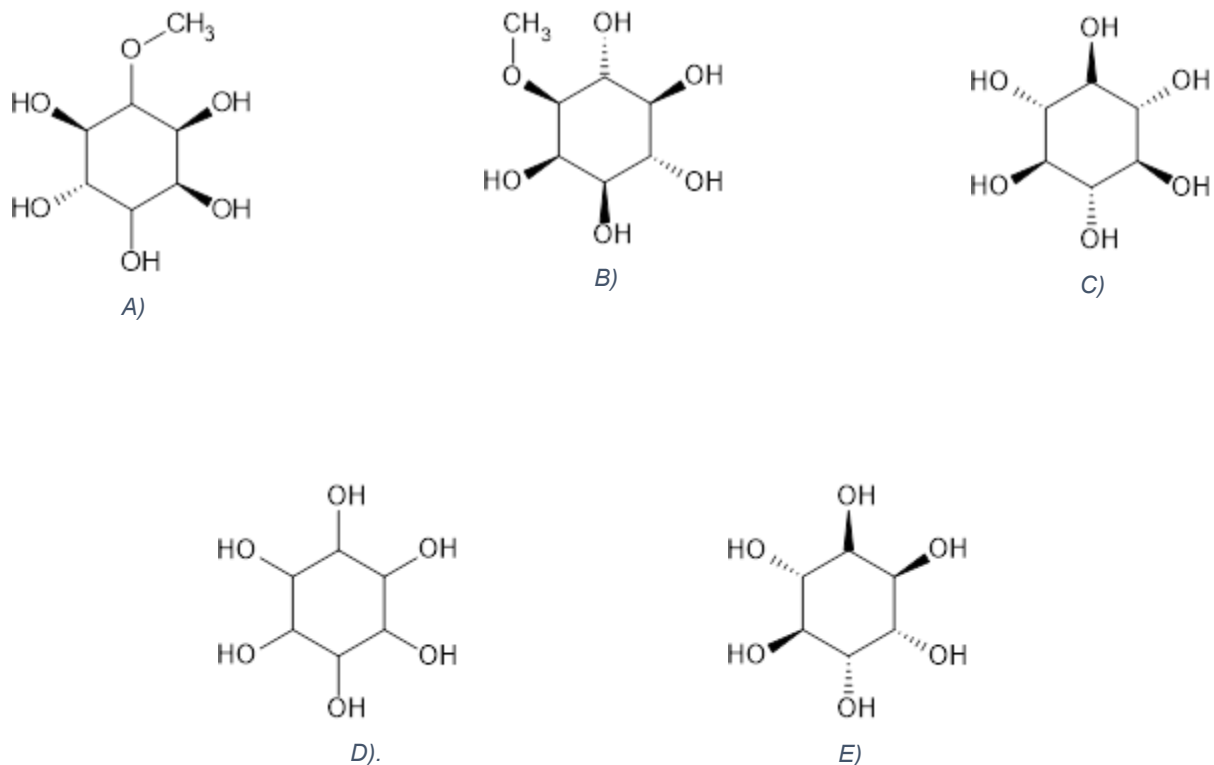


Figura 4. Estructura molecular de ciclitoles: A) D-pinitol, B) Bornesitol, C) Scyllo-inositol, D) Myo-inositol y E) D-chiro-inositol.



3.3 Formación de ciclitoles

Un aspecto importante que considerar es que, en la descrita ruta de biosíntesis de pinitol se lleva a cabo un paso de metilación en el que se involucran enzimas metiltransferasas. Para este efecto en específico se tienen como antecedentes estudios realizados en el grupo de investigación en donde se reportaron cambios en la metilación global de ADN y ARN en *Lepidium sativum* cultivado hidropónicamente en presencia de diferentes concentraciones de Cd (II) y/o Se (IV). En particular, se observó un aumento de la metilación del ADN en las plantas tratadas hasta niveles de concentración de 2 mg L⁻¹ Cd y 1 mg L⁻¹ Se en el medio de crecimiento. Para una mayor concentración del agente estresante, la metilación global del ADN tendió a disminuir⁴⁵. La aparente implicación de Se en procesos de biometilación, sustenta el enfoque de estudio para elucidar el efecto de Se en la síntesis de D-pinitol.

En la figura 5 se presenta la ruta de biosíntesis del pinitol. Se aprecia que el mio-inositol es el precursor de pinitol y es sintetizado por fosfato sintasa y mioinositol fosfato sintasa. También se describe la metilación del mio-inositol que se lleva a cabo en dos pasos, la metilación por mio-inositol 4-O-metiltransferasa del mio-inositol, y el siguiente paso es la epimeración de ononitol, el intermediario metilado es la clave del mecanismo para la producción de pinitol.

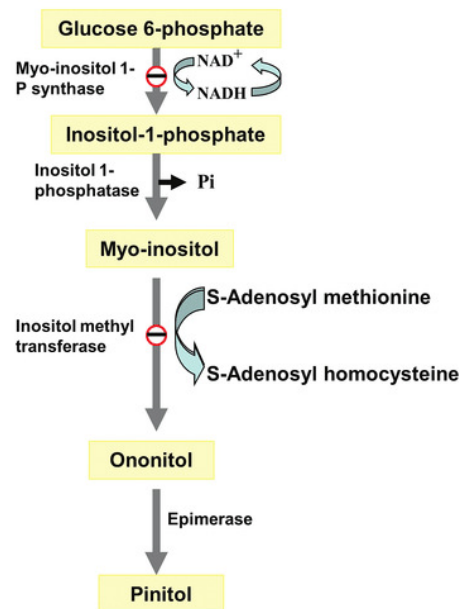


Figura 5. Esquema de biosíntesis de pinitol en plantas. El círculo abierto con una barra representa una reacción que limita la velocidad ⁴⁶.





3.4 Ciclitoles y su afectación bajo estrés abiótico.

Los ciclitoles, principalmente el D-pinitol que es el alcohol de azúcar que más se acumula en las leguminosas se ha observado que la concentración de este aumenta significativamente como respuesta al estrés abiótico. Se ha encontrado que durante esta síntesis de D-pinitol se haya involucrado la expresión de ciertos genes en diversos tejidos vegetales durante estrés por sequía⁴⁷.

Este efecto de aumento de ciclitoles, principalmente D-pinitol es de vital importancia para el estudio de esta tesis, por este motivo se han propuesto diferentes condiciones estresantes para la germinación de alfalfa.

3.5 Estado del arte en el análisis de ciclitoles en plántulas y brotes de semillas.

Los resultados de revisión bibliográfica centrada en los procedimientos de determinación de ciclitoles en material de plantas, se presentan de manera resumida en la Tabla 3. De interés para este trabajo de tesis es el uso de cromatografía de gases con detector masico. Entre las esperadas ventajas de esta herramienta de análisis, se pueden mencionar: (i) separación de los analitos del ambiente químico de muestra mediante una derivatización y extracción a solvente orgánico; (ii) preconcentración mediante ajuste de volúmenes; (iii) selectividad y buena eficacia en la etapa de derivatización mediante sililación; (iii) alta resolución en sistema GC; (iv) posibilidad de cuantificación mediante monitoreo de recciones múltiples logrando excelente selectividad y muy bajos límites de detección.





Tabla 3. Resumen breve de procedimientos analíticos reportados para el análisis de ciclitoles en plantas.

Contexto del estudio	Tratamiento de la muestra	Técnica analítica	Comentario	Ref.
Cuantificación de ciclitoles en almíbar de algarroba, en pulpa y semillas.	Extracción: 0.5 g de muestra fueron homogenizados en 25 mL de MeOH por sonicación, y posteriormente filtradas tomando 1 mL del volumen total para su análisis Derivatización: extracto + 400 µl HMSD: TMCS: Piridina (3:1:9)	GC-MS con un Shimadzu QP2010 Ultra. Escaneo en rango 30-500 m/z. Columna DB-5 MS.	La identificación de los compuestos con base la librería NIST. Resorcinol se utilizó como EI. El análisis mostro que el jarabe de algarrobo y la pulpa es ricas en D-pinitol.	48
<i>Agryrolobium roseum</i> . Colectada en terrenos montañosos de la región de Jammu (India)	Extracción: 500 g de biomasa seca en 2L de EtOH al 95%, 15 h, temp. ambiente Re-extracción en hexano. Purificación en columna de gel sílice utilizando acetato de etilo como disolvente de elución.	NMR FT, Bruker Avance DPX 400 MHz Usando D2O, MeOD y DMSO.	Se realizó la cuantificación de pinitol utilizando como estándar interno pirazinamina	49
Determinación de carbohidratos (D-pinitol) en <i>Gentiana cruciata</i>	Extracción: 500 mg de biomasa cruda en 5 mL de 2M ácido trifluoroacético, en baño de ultrasonido. Derivatización: NH ₂ OH·HCl en piridina: MeOH (4:1), adición de anhídrido acético y extracción a C ₂ H ₄ Cl ₂	GC-MS. Cromatógrafo Agilent 6890N. Detector 5973inert. Columna HP-5MS. Biblioteca espectral NIST02.	Sorbitol usado como EI. Derivados de mono azucares en forma de aldo nitrilos acetilados separados por GC. Presencia de diversos carbohidratos en <i>Gentiana cruciata</i> , que tienen importante actividad terapéutica. Entre azucares mayoritarios en forma libre se encontró D-Pinitol,	50





<p>Evaluación comparativa de inositoles, carbohidratos solubles y proteínas en cotiledones en brotes de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Vigna unguiculata</i>.</p>	<p>Extracción: 50 mg del material vegetal seco en 0.5 mL de metanol: cloroformo: agua (12:5:1, vol.) 30 min a 60 °C, agitaciones cada 10 min. Derivatización: 200µL de piridina y 50µL de BSTFA.</p>	<p>GC-MS. Cromatógrafo Agilent 6890. Columna HP-5. Espectrómetro de masas con cuadrupolo. Cromatogramas y espectros revisados usando ChemStation software</p>	<p>Adonitol como EI. Se observó un aumento de los metabolitos del germinado para <i>V. unguiculata</i> usando BSTFA como derivatizante.</p>	<p>51</p>
<p>Determinación de azúcares en semillas de soja, granos de maíz dulce y hojas de mostaza.</p>	<p>Extracción: material crudo liofilizado en etanol 80% (relación de masa muestra: EtOH 1:10) Evaporación y redisolución en agua.</p>	<p>Sistema cromatográfico HPLC 880PU. Columna asahipak NH2P-50. Detector ERC-7510 RI.</p>	<p>Utilizando D-Glucosa como estándar interno. Se desarrolló un nuevo método fluorimétrico HPLC para determinación de azúcares.</p>	<p>52</p>
<p>Determinación de ciclidos en especies de <i>Quercus</i>.</p>	<p>Extracción con agua a presión elevada, el extracto se mezcló con 100 µL de etanol (70:30). Derivatización: en dos pasos, oximación y trimetilsililación.</p>	<p>GC-MS Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector de masas de cuadrupolo 5973. Identificación tentativa comparando el índice de retención lineal y espectros de masas con estándares puros y n-alcenos. Biblioteca Wiley MS11</p>	<p>Determinación de 8 ciclitosles en madera de 21 especies de <i>Quercus</i>. Usando la extracción líquida presurizada y como EI fenil-β-D-galactopiranosido.</p>	<p>53_54</p>





<p>Aislamiento y determinación de pinitol de <i>Silene tomentella</i>.</p>	<p>Extracción: 1 kg de biomasa seca en 6 L de etanol a temp. ambiente; evaporación y redisolución con butanol.</p>	<p>LC-MS IR System 2000 Fourier Spectrometer. NMR</p>	<p>La identificación se basó en datos espectrales registrados comparados con la muestra original.</p>	<p>55</p>
<p>Determinación de fosfatos de inositol e inositol en matrices biológicas complejas.</p>	<p>Extracción: 0.5g de biomasa pulverizada se homogenizó con 3 mL del ácido acético 3.2 M (3 h, 25 °C) Centrifugado 5000g, 20 min, 48°. Dilución con NaOH acuoso (0.5mL, 1 M). Filtrado para eliminar aceites. Extracción con hexano.</p>	<p>HPLC agilent equipado con auto muestreador. MS con la Fuente de ESI en modo ion negativo. Columna anión Exchange. La adquisición de datos y su análisis se llevó a cabo con Xcalibur software.</p>	<p>Este método no requiere derivatización. El análisis se llevó a cabo utilizando un nuevo sensor sensible y enfoque selectivo basado en LC/MS/MS y como estándar interno Adenosina 5'-monofosfato</p>	<p>56</p>
<p>Determinación de ciclitoles en pulgones después de ingesta de la alfalfa.</p>	<p>Extracción: el pulgón liofilizado y molido fue mezclado con hexano y MeOH, posteriormente se diluyó con agua. Los extractos de melaza y alfalfa se trataron con resina de intercambio aniónico. Derivatización: se llevó a cabo con TMSi (trimetilsilano), donde los residuos fueron tratados con HMDS (hexamethyldisilazane) y TMCS</p>	<p>GC/MS</p>	<p>se identificaron ciclitoles en pulgones y melaza realizando derivatización con TMSi y analizando por GC/MS.</p>	<p>57</p>





	(trimethylchlorosilame) en piridina.			
Extracción de carbohidratos bioactivos de alcachofa.	<p>Extracción: se realizó por dos condiciones, MAE (microwave assisted extraction) y PLE (pressurized liquid extraction). Brácteas secas colocadas en 10 mL de agua ultrapura. En PLE se introdujeron brácteas de alcachofa en una celda de extracción de acero inoxidable de 11 mL usando como disolvente agua desionizada.</p> <p>Derivatización: 1 mL del extracto de brácteas de alcachofas mezclado con 0.5 mL de una solución etanólica al 70% con fenil-β-D-Glucósido como estándar interno. Los derivatizados fueron preparados a partir de trimetilsilil oxima (TMS)</p>	<p>Análisis GC en un cromatógrafo de gases 7890^a equipado con FID de Agilent Technologies. Columna capilar de metilsilicona Zebron ZB-1MS utilizando nitrógeno como gas portador. Los carbohidratos fueron identificados usando estándares y datos previos obtenidos de la literatura, la cuantificación se obtuvo directamente de las áreas de picos.</p>	<p>Primera propuesta de extracción asistida por microondas y líquido presurizado para la extracción de carbohidratos bioactivos, analizados por GC utilizando TMS como agente derivatizante y Fenil-β-D-Glucósido como EI.</p>	58





Capítulo IV. Técnicas analíticas utilizadas para el análisis ionómico y metabolómico.

4.1 Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES - Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry)

La espectrometría atómica abarca una serie de técnicas analíticas utilizadas para determinar composición elemental de alguna muestra examinando el espectro electromagnético o el espectro de masas. Hay algunas técnicas que identifican un elemento por su espectro electromagnético como son: espectrometría de absorción atómica con atomización en llama (FAAS) o en horno de grafito (ETA-AAS), espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas⁵⁹. Las técnicas analíticas que identifican un elemento por su espectro de masas y permiten su cuantificación incluyen espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) con diferentes separadores de masas, desde un simple cuadrupolo hasta instrumentos equipados con triple cuadrupolo (ICP-QQQ-MS)⁵⁹.

En la técnica de espectrometría de emisión atómica MP-AES, se obtiene la atomización y excitación térmica de átomos y, debido a procesos de relajación, cada elemento emite un espectro característico, en el cual cada línea de emisión corresponde a una transición de energía de electrones valentes permitida⁵⁹. Con esta técnica, se puede cuantificar metales y metaloides mayoritarios y traza en plantas, proporcionando la información sobre la captación elemental en la planta, obteniendo así el perfil ionómico.

4.2 Cromatografía de Gases

Cromatografía de gases (GC) es la técnica de separación adecuada para el análisis de compuestos volátiles, semivolátiles y termoestables. En este trabajo, se planea determinar ciclitoles, cuya alta polaridad impide directa separación por GC y también por cromatografía de líquidos. Es por ello, que es necesario realizar una derivatización pre-columna, preferentemente mediante sililación. Dentro de la cromatografía de gases existen una amplia variación de detectores tales como: EI, PID, FID, ECD, FTIR y MS, siendo el acoplamiento GC-MS de interés en este trabajo de tesis. La GC-MS es una de las técnicas más útiles para evaluar el perfil metabolómico de alimentos. El acoplamiento de GC a la espectrometría de masas (GC-MS) brinda información estructural para una identificación más confiable y permite la cuantificación de los metabolitos⁶⁰. Los iones de interés para la identificación de D-pinitol es el fragmento con m/z 133, corroborándolo con el uso de GC-MS de triple cuadrupolo, con el uso de esta técnica aumenta la selectividad y la detección, todo gracias al uso de MRM (monitoreo de reacciones múltiples)⁶¹.





Tabla 4. Algunos ejemplos de los estudios enfocados en efecto de estrés sobre perfil de metabolitos en plantas, realizados utilizando GC-MS.

Planta	Estrés	Observaciones	Referencia
<i>Hojas de A. greatheadii</i>	Patrones de lluvia, altitud, tipo de suelo y pH del suelo.	Monitoreo de las variaciones e identificación de compuestos fitoquímicos.	62
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hídrico	Cuantificación de ácido abscísico	63
<i>Letinula Edodes</i>	Temperatura	metabolómica no dirigida	64
<i>Trigo</i>	Ambientales, muestras de distintos lugares.	metabolómica no dirigida de ceras cuticulares	65
<i>Sauceda Glauca y Puccinellia Tenuiflora</i>	Salino.	Evaluación de metabolitos primarios.	66

La síntesis de ciclitoles en plantas como respuesta a condiciones de estrés, abre la posibilidad de establecer las condiciones óptimas para la obtención de estos ciclitoles derivados de plántulas de alfalfa, los cuales tienen acción benéfica en la salud humana tales como la mejora del control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo II. Exclusivamente el uso de D-pinitol administrado en ayunas reduce los niveles de glucosa plasmática debido a su actividad similar a la insulina.





Capítulo V. Objetivo del Proyecto.

Evaluar el efecto de estrés abiótico provocado por Cr (VI), Se (IV), y NaCl en plántulas de alfalfa, enfocándose en su crecimiento, en el perfil iónico y en la concentración de ciclitoles en biomasa. En el último caso, el objetivo consiste en el desarrollo y aplicación de un procedimiento de determinación de D-pinitol y de myo-inositol por GC-MS/MS.





Capítulo VI. Parte experimental.

6.1 Materiales y reactivos.

6.1.1 Equipo de laboratorio

- Purificador de agua destilada Martes Flex/cole parmer instrument Co. Modelo 60648.
- Purificador de agua Mili Q labconco Water Pro-PS.
- Balanza de precisión ME303 Mettler Toledo.
- PHS-3BW Benchtop pH meter
- Liofilizadora modelo 10-269 de Labconco y frasco Fast-Freeze 600 mL Labconco.
- Parrilla AccuBlock Digital Dry Baths D1200 Labnet.
- Horno Felisa
- Bk-2000 Ultrasonic Cleaner
- Vortex 16700 mixer (Thermovne)
- Microcentrifuga (Gusto)
- Centrifuga

6.1.2 Material de laboratorio

- Matrices aforados
- Vasos de precipitado
- Micro espátulas
- Espátulas
- Material de plástico (Tubos Falcón de 15 mL y 50 mL, tubos de Eppendorf de 1.5 mL y 2 mL)
- Tubos de ensayo
- Micropipetas
- Mortero con pistilo
- Frasco IsoLab con tapa de rosca (1 y 2 L)
- Gradillas metálicas
- Contenedores de plástico
- Malla mosquitera polimérica
- Insertos
- Viales

6.1.3 Instrumentación analítica

- Espectrómetro de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas, 4100 (MP-AES, Agilent Technologies).
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo modelo SCION TQ (GC-MS).





6.1.4 Reactivos y estándares

6.1.4.1 Reactivos para medio de crecimiento

- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
- Cloruro de sodio
- Selenito de sodio

Sales utilizadas para la preparación del medio de crecimiento Hoagland:

- Cloruro de calcio ($CaCl_2$)
- Nitrato de potasio (KNO_3)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- Molibdato de amonio ($(NH_4)_6MO_7O_{24}$)
- Cloruro de manganeso ($MnCl_2$)
- Nitrato de Zinc ($Zn(NO_3)_2$)
- Cloruro de hierro ($FeCl_3$)
- Sulfato de cobre ($CuSO_4$)
- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Fosfato mono potásico (KH_2PO_4)

6.1.4.2 Reactivos para digestión ácida

- Reactivos utilizados para tratamiento de muestra: Ácido nítrico concentrado (HNO_3) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

6.1.4.3 Estándares para determinación de contenido total de elementos por MP-AES

- Estándares individuales de Cr, Se Mo, Zn, Fe, Cu, Mg, Ca, Na, K (1000 mg L^{-1}) de sigma Aldrich.

6.1.4.4 Reactivos para la determinación de metabolitos mediante GC-MS

- Metanol
- Piridina
- BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida)

6.2 Semillas

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) empleadas fueron de la marca “SEED COMPANY FALCON”:

6.3 Softwares

- Microsoft Office 365
- Ms Workstation, MS Data Review versión 8.2, Bruker Daltonics-SCION MS 45X-GC
- AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and identification System)





- NIST MS 2.0

6.4 Condiciones de crecimiento y obtención de biomasa.

Las semillas de alfalfa fueron adquiridas en mercados especializados, para eliminar las posibles fuentes de contaminación, previo a la siembra las semillas fueron lavadas con 70% de etanol, durante 5 min, después con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min, por último, se enjuagaron con agua desionizada. La germinación, crecimiento y exposición de las plántulas se llevaron a cabo en sistemas hidropónicos (Figura 6), utilizando como medio de cultivo solución Hoagland modificada a pH 5.8 (en la Tabla 5 se muestran los componentes y sus respectivas concentraciones).

Tabla 5. Composición de medio Hoagland modificado.

Compuesto	Concentration final
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.35 mM
CaCl_2	2.1 mM
KNO_3	1.2 mM
MgCl_2	0.91 mM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.7 μM
MnCl_2	3.9 μM
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	0.6 μM
FeCl_3	10 μM
CuSO_4	0.44 μM
H_3BO_3	23 μM
KH_2PO_4	0.98 nM

Se utilizaron como fuentes de Cr (VI) y Se (IV) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y Na_2SeO_3 respectivamente, además de NaCl. Las condiciones de exposición para cada agente estresante se presentan en la Tabla 6; cada tratamiento se realizó por duplicado.

Tabla 6. Concentraciones en medio de crecimiento de cada agente estresante.

Cr (VI) mg L ⁻¹	NaCl, mg L ⁻¹	Se (IV) mg L ⁻¹
0.5	0.5	0.5
3.0	3.0	2.0
5.0	5.0	3.5
10.0	10.0	5.0

La germinación se llevó a cabo utilizando 100 L de medio de cada condición de estrés y 1.0 g de semillas de alfalfa previamente lavadas. La primera etapa de crecimiento comenzó con 48 horas de oscuridad (periodo en el cual comienzan a brotar las radículas), posteriormente las condiciones fueron fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad, humedad relativa de 60% y temperatura de 25 °C, esto durante un periodo de 15 días.

En la Figura (6) se presentan los sistemas hidropónicos utilizados en este estudio para la germinación y crecimiento de *Medicago sativa*.





Figura 6. Sistema de crecimiento utilizados para la germinación y crecimientos de Medicago sativa.

Al término de los 15 días de crecimiento/exposición, las plántulas obtenidas fueron lavadas con CaCl_2 0.05M y agua desionizada. La biomasa fue congelada, liofilizada y homogenizada para su preservación y posterior análisis.

Considerando que las muestras obtenidas tienen la composición química compleja y que los objetivos de estudio son diversos, se propuso un esquema general de tratamiento de muestra, el cual se muestra en la Figura (7); las actividades propuestas en este proyecto fueron: I) La determinación del contenido total de metales/metaloides mayoritarios y traza en biomasa, II) Determinación de Cr(VI) en medio de cultivo después del periodo de crecimiento/exposición, III) Desarrollo de procedimiento analítico para la determinación de D-pinitol y myo-inositol mediante GC-MS utilizando el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).



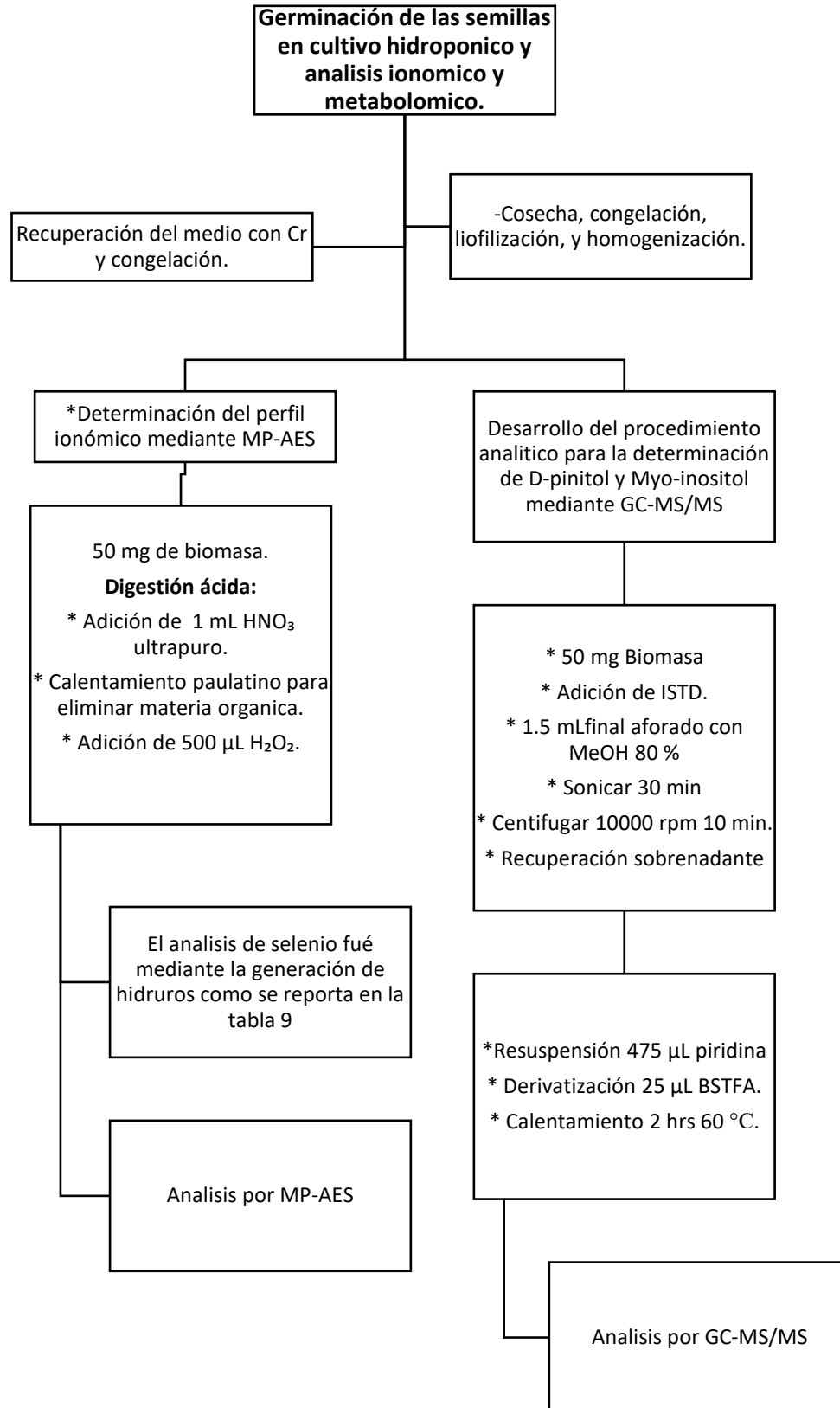


Figura 7. Esquema del procedimiento analítico que se llevará a cabo para la evaluación iónico y metabólico.





Capítulo VII. Resultados y discusión.

7.1 Introducción

Con base en los resultados obtenidos en estudios previos realizados dentro del grupo de trabajo (^{32,33}), se seleccionó a *Medicago sativa* como modelo de estudio para el desarrollo de este proyecto; debido a su rápida germinación, fácil accesibilidad de las semillas, crecimiento en sistemas hidropónicos, periodos cortos de germinación, más del 70% de conversión de selenio inorgánico (iSe) a selenio orgánico (oSe)³². Además, a partir de un análisis metabolómico no dirigido realizado en extractos metanólicos de plantas expuestas a Se (IV), se observó una regulación positiva del metabolito D-pinitol cuando las plantas fueron expuestas a bajas concentraciones de Se (IV) (0.5 mg L⁻¹). El efecto del Se en la síntesis de ciclitoles no ha sido estudiado, pero este tema parece interesante debido a que la ruta de biosíntesis de pinitol incluye un paso de metilación catalizado por enzimas metiltransferasas y existen numerosas evidencias sobre la participación de Se en este tipo de procesos. Como uno de los antecedentes se deben mencionar estudios realizados en el grupo de investigación en donde se encontraron cambios en la metilación global de ADN y ARN en germinados de *Lepidium sativum* cultivados hidropónicamente en presencia de diferentes concentraciones de Cd (II) y/o Se (IV)⁶⁷; en este estudio se observó un aumento de la metilación del ADN en las plantas expuestas a concentraciones de 2.0 mg L⁻¹ de Cd y 1.0 mg L⁻¹ de Se en medio de crecimiento. Por su parte, la metilación global de ADN tendió a disminuir conforme aumentaba la concentración de agentes estresantes. Es también importante que los cambios en la concentración de D-pinitol bajo condiciones de estrés tienen un impacto importante en plantas; tal es el caso de *Mesembryanthemum crystallinum*, para la cual se ha sugerido el rol de D-pinitol como regulador osmótico cuando la planta es expuesta a sequía y altas concentración de NaCl en suelos.

Aunado a lo anterior, la alfalfa, en sus diversas variedades, es una de las especies leguminosas más cultivadas e importantes para la alimentación del ganado, tanto por la cantidad de forraje obtenido por superficie cultivada, su valor nutricional y su facilidad de adaptación a diversos ambientes. Se ha descrito que esta planta tiene la capacidad de bioacumular elementos Cr, Cd, Pb y As, sin sobrepasar los niveles fitotóxicos, por ello se le ha considerado una planta prometedora para la revegetación y la Fito estabilización de metales pesados e hidrocarburo.

Por lo anterior, es que para este proyecto de tesis se planteó evaluar tres estresantes abióticos Cr (VI), Se (IV), y NaCl, en función de: 1) el crecimiento y generación de biomasa; 2) la captación de Cr, Se y Na en biomasa; 3) la captación de elementos esenciales (mayoritarios y minoritarios) y 4) síntesis de D-pinitol y myo-inositol. Lo anterior se muestra en el esquema de trabajo de la figura 7.



7.2 Obtención de plántulas de alfalfa expuestos a diferentes estresantes.

Al término del periodo de exposición, se determinó la cantidad de biomasa generada para cada uno de los estresantes a las diferentes concentraciones, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 8 y 9.



Ilustración 1. Plántulas de alfalfa.

En las plántulas de alfalfa crecidos con Se (IV) (Figura 8) se observa un aumento de la cantidad de biomasa generada en las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg L⁻¹ de selenio en el medio respecto al control, siendo la concentración de 2.0 mg L⁻¹ donde el crecimiento es mejor. Aunque la cantidad de biomasa generada en las concentraciones de 3.5 y 5.0 mg L⁻¹ es menor que la registrada para la condición de 2.0 mg L⁻¹, las diferencias no son muy grandes respecto a la producida en el tratamiento control, lo que concuerda con los estudios previos³².

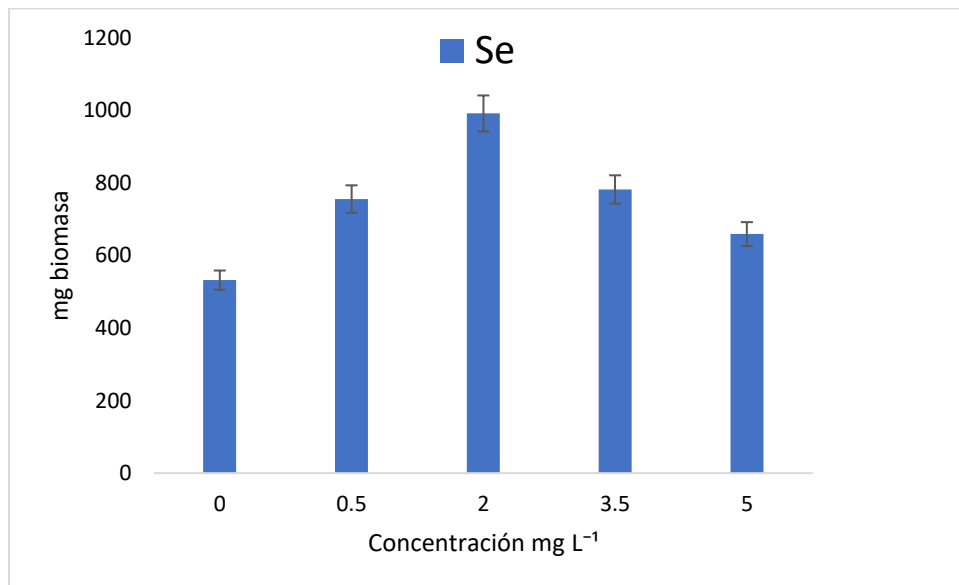


Figura 8. Cantidad de biomasa generada en las diferentes concentraciones de Se (IV) agregados al medio de cultivo.

Para el caso de la exposición a Cr (VI) se observa un aumento en todos los tratamientos con cromo respecto al tratamiento control (Figura 9). Sin embargo, entre las diferentes concentraciones del estresante no se aprecian importantes diferencias en la cantidad de biomasa generada, aunque existe una tendencia de inhibición de crecimiento con el aumento de la concentración de Cr (VI) en medio. Existen casos donde se demuestra que el cromo afecta el crecimiento de algunas plantas como lo son: *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Oriza sativa*, entre otros, en concentraciones diversas de Cr (VI) en biomasa, hasta 500 mg kg⁻¹,



con tiempo de exposición que va desde 1-21 días de exposición⁶⁸. Por último, en el caso de NaCl como agente estresante, conforme aumenta la su concentración del contenido de NaCl en el medio de crecimiento, paulatinamente aumenta la cantidad de biomasa generada (figura 9), aunque el crecimiento parece ser deteriorado en la presencia de baja concentración de NaCl (0.5 mg L^{-1}) mientras que por encima de 5 mg L^{-1} ya no se observa un aumento de la cantidad de biomasa. Similares resultados fueron reportados en diversas. Siendo las concentraciones de 5.0 y 10 mg L^{-1} de NaCl en donde se obtuvo la mayor cantidad de biomasa comparado con el control y los tratamientos de 0.5 y 3.0 mg L^{-1} , (este comportamiento de plantas tolerantes a estrés salino se observó en estudios realizados en ⁶⁹).

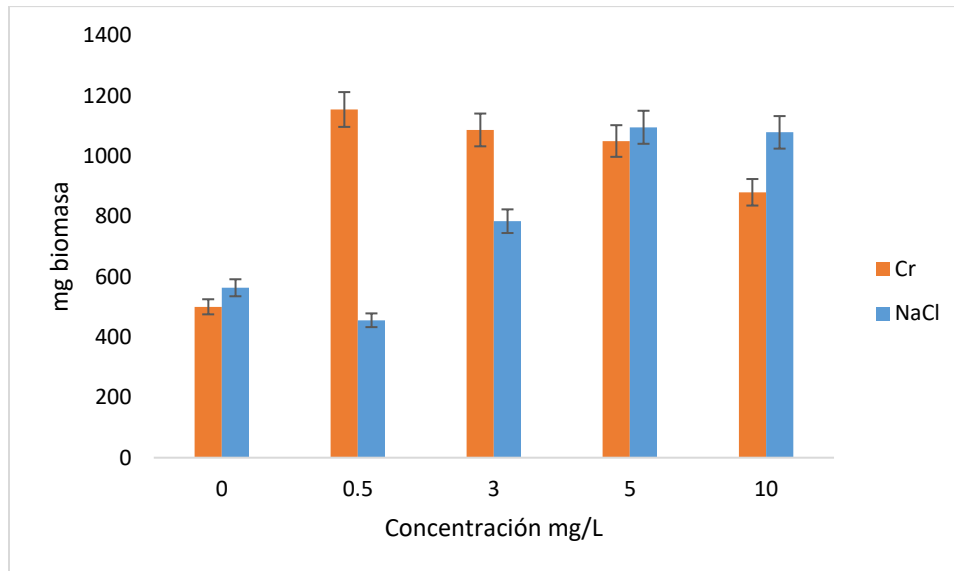


Figura 9. Cantidad de biomasa en las diferentes concentraciones de Cr (VI) y NaCl en el medio de crecimiento

Cabe mencionar que no se observaron efectos fitotóxicos como clorosis o malformación en ninguna de las diferentes condiciones de estrés.





7.3 Determinación de metales mayoritarios y traza en biomasa por MP-AES

La determinación de elementos se realizó a partir de biomasa hidrolizada, para lo cual se tomaron 50 mg de muestra liofilizada se adicionó 1 mL de HNO₃ concentrado, las muestras se calentaron a 70 °C durante 30 min, posteriormente la temperatura se ajustó a 110 °C y se mantuvo por 2 h; enseguida se realizó la adición de 0.5 mL de H₂O₂ y se procedió a calentar las muestras a 110°C por 30 min. Al término de la hidrólisis el volumen del hidrolizado se ajustó a 2 mL con agua desionizada.

La determinación de Na, Cr, Ca, Mg, Fe, Zn, Mo y Cu en hidrolizados de biomasa se llevó a cabo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (MP-AES) con introducción de muestra convencional. Por su parte, para selenio se generó su hidruro, utilizando el sistema de introducción MSIS (MSIS - Multimode Sample Introduction System, por sus siglas en ingles). Las condiciones de la reacción para llevar a cabo la formación de hidruro de selenio se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones óptimas para la generación de hidruros durante el análisis de selenio.

% NaOH	% NaBH ₄	HCl M
1.0	1.5	1.0

Para cada uno de los elementos, el proceso de selección de los parámetros instrumentales se realizó mediante el monitoreo de la señal analítica de longitud de onda seleccionada en función de las variaciones de la posición del visualizador y la presión de nebulización, empleando el criterio de la mejor posible relación señal/ruido. Los parámetros instrumentales con los cuales se llevó la determinación de cada elemento se presentan en las tablas 8 y 9.





Tabla 8. *Parámetros instrumentales para la determinación de elementos mayoritarios y minoritarios en biomasa y medio de cultivo, utilizando MP-AES.*

Parámetros Instrumentales de MP-AES				
Nebulizador		One Nebulizer		
Cámara de niebla		Ciclónica de un solo paso		
Tiempo de integración		3 s		
Flujo de introducción de muestra		1 mL min ⁻¹		
Elemento	Longitud de onda (nm)	Presión de Nebulizador (kPa)	Posición de visualizador	Velocidad de Bomba
Mg	285.213	240	-10	6 rpm
Ca	393.366	240	-10	6 rpm
Na	588.995	240	-10	6 rpm
K	769.897	240	-10	6 rpm
Mo	390.295	220	-30	8 rpm
Zn	213.857	220	-30	8 rpm
Fe	302.064	220	-30	8 rpm
Cu	324.754	220	-30	8 rpm
Cr	425.43	240	-10	15 rpm

Tabla 9. *Parámetros instrumentales para la determinación de selenio en biomasa, mediante generación de hidruros y MP-ES.*

Parámetros Instrumentales de MP-AES				
Cámara de introducción de muestra		MSIS		
Tiempo de integración		3 s		
Flujo de introducción de muestra		1 mL min ⁻¹		
Elemento	Longitud de onda (nm)	Presión de Nebulizador (kPa)	Posición de visualizador	Velocidad de Bomba
Se	196.026	240	-10	20 rpm

La cuantificación de todos los elementos se realizó mediante el método de calibración externa, el rango de calibración para los elementos mayoritarios (Na, Ca, Mg, y K) fue de 0.1-10 mg L⁻¹, mientras que para los elementos minoritarios (Se, Cr, Mo, Zn, Fe y Cu) fue de 0.05 - 2.0 mg L⁻¹. En la Tabla (10) se presentan las funciones de calibración obtenidas de cada una de las longitudes de onda seleccionadas para cada elemento.





Tabla 10. Funciones de calibración obtenidas para cada longitud de onda seleccionada.

Elemento	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LC, $\mu\text{g L}^{-1}$	Función de calibración	r^2
Mg	0.23	0.77	$\text{Int}=1.248 \times 10^5\text{c}+2.70 \times 10^4$	0.9994
Ca	1.1	3.7	$\text{Int}=1.178 \times 10^5\text{c}-4.90 \times 10^3$	0.9983
Na	5.6	19	$\text{Int}=2.490 \times 10^5\text{c}+4.50 \times 10^3$	0.9976
K	2.0	6.7	$\text{Int}=2.058 \times 10^4\text{c}+1.32 \times 10^4$	0.9954
Mo	8.5	28	$\text{Int}=5.198 \times 10^3\text{c}-3.70 \times 10^2$	0.9991
Zn	7.6	25	$\text{Int}=1.160 \times 10^4\text{c}-1.01 \times 10^2$	0.9994
Fe	5.0	17	$\text{Int}=9.278 \times 10^3\text{c}-1.02 \times 10^2$	0.9995
Cu	2.7	8.8	$\text{Int}=1.356 \times 10^5\text{c}-1.77 \times 10^2$	0.9994
Cr	1.4	4.7	$\text{Int}=2.218 \times 10^4\text{c}-2.61 \times 10^2$	0.9987
Se	140	467	$\text{Int}=3.119 \times 10^3\text{c}-3.01 \times 10^2$	0.9980

Para evaluar la exactitud de las determinaciones en biomasa, se realizó el análisis del material de referencia NIST 1572 Citrus Leaves y en la Tabla 11 se muestra la comparación entre los resultados obtenidos y los valores certificados, mismos que son indicativos de una aceptable exactitud.

Tabla 11. Valores certificados y resultados típicos obtenidos de la determinación de elementos en el material de referencia NIST 1572.

Elemento	Análisis del material de referencia	
	Valor certificado, % en masa	Valor encontrado, % en masa
Mg	0.58 ± 0.03	0.43 ± 0.02
Ca	3.15 ± 0.10	2.54 ± 0.99
K	1.82 ± 0.06	1.73 ± 0.07
	Valor certificado, $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor encontrado, $\mu\text{g g}^{-1}$
Cu	16.5 ± 1.0	20.4 ± 2.6
Fe	90 ± 10	96.0 ± 12
Na	160 ± 20	170 ± 15

El análisis de los elementos en la biomasa, bajo diferentes condiciones de exposición se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Para evaluar la capacidad de las plántulas para captar y acumular los agentes estresantes, para cada una de sus concentraciones empleadas en el medio, se realizó la determinación de estos elementos en biomasa. Los resultados obtenidos para Na son incluidos en la Tabla 13, mientras que en las tablas 14 y 15 se muestran resultados obtenidos para Cr y Se, respectivamente. Para cada uno de los agentes estresantes, se observa un paulatino incremento de su concentración en biomasa, conforme aumenta la concentración aplicada en el medio de crecimiento.





7.3.1 Resultados de determinación del contenido elemental en biomasa

Los resultados obtenidos del contenido de elementos mayoritarios y traza se presentan en la tabla 12. Los datos mostrados por estresante son los promedios de las réplicas analizadas con los respectivos valores desviación estándar.

En estos datos es posible observar cierto comportamiento de algunos elementos en función del estresante y su concentración. Por ejemplo, para cromo se puede observar un aumento en el contenido de casi todos los elementos determinados (Tabla 12) en todas las condiciones de exposición comparado con el tratamiento control, exceptuando Mg y K. Para el caso de NaCl los niveles encontrados de Ca, Mo, Fe y Cu son mayores en todas las condiciones de estrés con este agente respecto comparado con el control. Por último, para el caso de la biomasa obtenida en presencia de Se la cantidad determinada de Ca, Zn, Fe y Cu fue mayor que la encontrada en el control.

Tabla 12. Resultados de determinación de metales en alfalfa expuesta a las distintas condiciones de estrés Cr (VI), NaCl y Se (IV).

Concentraciones de elementos en biomasa seca, promedio \pm DE, masa seca, n=3								
Condición mg L ⁻¹	mg g ⁻¹				µg g ⁻¹			
	Mg	Ca	Na	K	Mo	Zn	Fe	Cu
Cr								
0.0	6.17 \pm 0.18	5.02 \pm 0.12	0.10 \pm 0.01	25.5 \pm 0.5	55.5 \pm 2.5	45.0 \pm 2.0	84.0 \pm 2.0	11.0 \pm 0.2
0.5	3.65 \pm 0.21	8.02 \pm 0.08	0.10 \pm 0.04	20.6 \pm 0.6	57.0 \pm 2.0	51.0 \pm 2.0	94.0 \pm 30	13.0 \pm 0.8
3.0	3.61 \pm 0.25	7.37 \pm 0.08	0.13 \pm 0.01	21.5 \pm 0.2	64.0 \pm 3.0	50.0 \pm 2.0	100 \pm 3	13.0 \pm 2.0
5.0	4.17 \pm 0.21	8.21 \pm 0.14	0.13 \pm 0.01	24.1 \pm 0.6	61.9 \pm 5.9	50.0 \pm 3.0	88.0 \pm 3.0	14.0 \pm 0.1
10.0	2.90 \pm 0.24	8.69 \pm 0.06	0.22 \pm 0.08	20.0 \pm 0.5	62.1 \pm 3.7	51.0 \pm 3.0	71.0 \pm 3.0	14.0 \pm 1.0
NaCl								
0.5	2.70 \pm 0.25	5.92 \pm 0.08	0.30 \pm 0.01	18.6 \pm 0.6	57.0 \pm 2.0	46.0 \pm 2.0	87.0 \pm 3.0	13.0 \pm 0.1
3.0	3.00 \pm 0.22	7.28 \pm 0.15	0.42 \pm 0.02	30.2 \pm 0.5	64.0 \pm 3.0	43.0 \pm 3.0	102 \pm 2	14.0 \pm 0.1
5.0	3.90 \pm 0.19	7.45 \pm 0.19	1.74 \pm 0.01	29.3 \pm 0.6	77.0 \pm 3.0	50.0 \pm 2.0	113 \pm 2	17.0 \pm 0.1
10.0	3.90 \pm 0.22	8.09 \pm 0.13	1.82 \pm 0.04	22.9 \pm 0.6	62.0 \pm 2.0	49.0 \pm 2.0	111 \pm 3	15.0 \pm 1.0
Se								
0.5	2.40 \pm 0.25	6.82 \pm 0.08	0.56 \pm 0.01	25.5 \pm 0.7	69.0 \pm 2.0	46.0 \pm 2.0	95.0 \pm 3.0	12.0 \pm 0.1
2.0	3.00 \pm 0.21	6.27 \pm 0.11	0.60 \pm 0.02	26.4 \pm 0.5	57.0 \pm 3.0	50.0 \pm 2.0	103 \pm 20	13.0 \pm 0.7
3.5	3.27 \pm 0.23	7.55 \pm 0.08	0.62 \pm 0.01	21.2 \pm 0.6	46.0 \pm 2.0	51.0 \pm 2.4	101 \pm 3	14.0 \pm 0.8
5.0	2.50 \pm 0.24	8.88 \pm 0.07	0.32 \pm 0.02	21.7 \pm 0.6	55.0 \pm 2.0	48.0 \pm 2.0	89.0 \pm 3.0	12.0 \pm 0.2

Para el caso del contenido elemental de los estresantes (Cr, Se y Na para NaCl), se observó para todos que los niveles encontrados en biomasa aumentaban conforme iba en aumento la concentración del respectivo agente estresante en el medio.





Tabla 13. Concentración de Cr obtenida en biomasa tras someter los cultivos de alfalfa a dicromato de potasio en el medio de cultivo.

Condición mg L ⁻¹	µg g ⁻¹ , ± DE µg g ⁻¹
Control	NA
0.5 mg L ⁻¹	20.0 ± 3.0
3 mg L ⁻¹	120 ± 17.0
5 mg L ⁻¹	189 ± 30.0
10 mg L ⁻¹	387 ± 45.0

Tabla 14. Concentración de Se obtenida en biomasa tras someter los cultivos de alfalfa a selenito en el medio de cultivo.

Condición mg L ⁻¹	µg g ⁻¹ , ± DE µg g ⁻¹
Control	NA
0.5	50 ± 15
2.0	125 ± 19
3.5	274 ± 27
5.0	370 ± 34

La determinación de diez elementos en biomasa obtenida bajo diferentes condiciones de estrés (tres agentes estresantes con cinco concentraciones de cada uno en el medio de crecimiento) arrojó un número muy grande de datos con alta dimensionalidad, lo que impidió evaluar de manera global el impacto causado por los agentes estresantes en la estructura de datos del todo el sistema. Para disminuir la dimensionalidad y observar mejor la estructura de los datos, se llevó a cabo el análisis multivariante, utilizando el método de análisis de componentes principales (PCA – principal component analysis, por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos de este análisis estadístico se describen en la sección de integración e interpretación de resultados.

7.3.2 Evaluación del factor de captación biológica (BCF)

A partir de estos resultados se calculó el factor de biocaptación para cada uno de los agentes estresantes (BCF-Bioconcentration factor por sus siglas en inglés), el cual establece la relación entre la concentración del estresante en biomasa respecto a su concentración en el sustrato. La fórmula utilizada es:

$$BCF = \frac{mg\ L^{-1}\ de\ elemento\ en\ biomasa}{mg\ L^{-1}\ de\ elemento\ en\ medio}$$

Los valores del BCF calculados se presentan en las Tablas 15 para Cr y Na y en Tabla 16 para Se. En el caso de Cr (VI), no se obtuvo la biofortificación ya que los valores BCF fueron inferiores que 1 para todas concentraciones de cromo ensayadas. Aunado a ello, el BCF se mantuvo prácticamente constante, independientemente de la concentración de cromo hexavalente en la solución de Hoagland (valores BCF: 0.38-0.40).





Tabla 15. Factores de bioconcentración captación biológica calculados para Cr y Na.

Condición mg L ⁻¹	BCF Cr	BCF Na
0.5	0.40	1.05
3.0	0.40	0.35
5.0	0.38	0.87
10	0.39	0.46

En el caso de sodio y selenio, la captación por las plántulas era más eficiente respecto al cromo, con clara tendencia hacia biofortificación cuando se utilizaban bajas concentraciones de estos elementos en el medio (0.5 mg L⁻¹). Con el aumento de concentración del agente estresante, para ambos elementos ocurrió una gradual disminución del BCF.

Tabla 16. Factores de bioconcentración captación biológica calculados para Se.

Condición mg L ⁻¹	BCF Se
0.5	1.01
2.0	0.62
3.5	0.73
5.0	0.70



7.4 Determinación de D-pinitol y myo-inositol mediante GC-MS.

GC-MS es una poderosa herramienta para la determinación de metabolitos relativamente apolares, volátiles, semivolátiles y termoestables; el análisis de compuestos muy polares, como es el caso de los ciclitoles, también es posible, pero requiere de un proceso de derivatización pre-columna que añade costo y tiempo de análisis, sin embargo, es necesario para hacer posible su introducción y retención en la columna y mejorar la resolución cromatográfica. Aunado a ello, en la etapa de derivatización, se logra cierta limpieza de muestra. La sililación es el método de derivatización usado con mayor frecuencia en análisis de cromatografía de gases; su propósito es reducir la polaridad del analito y aumentar su termo-estabilidad. La reducción de la polaridad está relacionada con el aumento de la volatilidad y por esta razón la sililación se utiliza con frecuencia para permitir el análisis por GC de compuestos polares como azúcares o aminoácidos. En términos generales, la sililación es la introducción de un grupo sililo en una molécula, generalmente en sustitución de un hidrógeno activo. Dentro de la gran cantidad de reactivos de sililación, los dos grupos de protección más comúnmente usados son trimetilsililo (TMS), *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). Ambos tipos de agentes derivatizantes reaccionan con una serie de grupos funcionales, aunque con una eficacia variable (Figura 10).

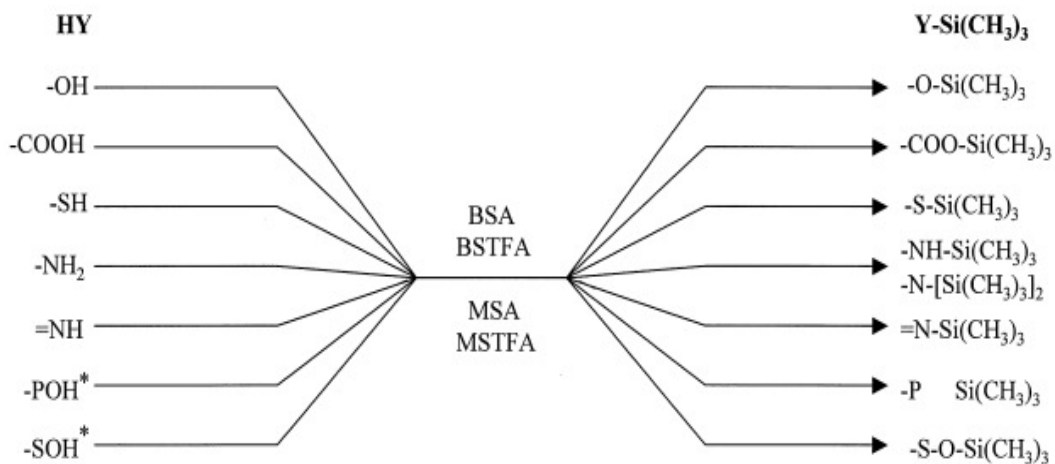


Figura 10. Grupos funcionales susceptibles a la derivatización por reactivos de sililación³³.

El reemplazo del hidrógeno activo por un grupo sililo reduce la polaridad del compuesto y reduce la formación de los enlaces de hidrógeno. Muchos compuestos con grupos hidroxilo y amino considerados no volátiles o inestables a 200-300°C se han analizado con éxito en GC después de la sililación. Los derivados sililados presentan señales cromatográficas estrechas de pequeña anchura y simétricas (propios de la alta resolución). Tal como se muestra en la Figura 11, la reacción de sililación consiste en la sustitución de los hidrógenos activos en los grupos -OH, -COOH, -NH, NH₂ y -SH por un grupo sililo. La facilidad de reactividad del grupo funcional y eficacia de sililación es en el siguiente orden:

Alcohol>Fenol>Carboxilo>Amina>Amida/hidroxilo.

Considerando lo anterior y recordando las características estructurales del D-Pinitol y myo-inositol (compuestos altamente polares y no volátiles), para poder realizar su determinación por GC-MS se llevó cabo la derivatización pre-columna de los dos ciclitoles utilizando como agente



derivatizante N, O bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). El esquema de reacción de los compuestos con grupo funcional hidroxilo (tales como ciclitoles) dos ciclitoles se presenta en la figura (11) y figura (12). Cabe mencionar que esta reacción requiere de las condiciones anhidras.

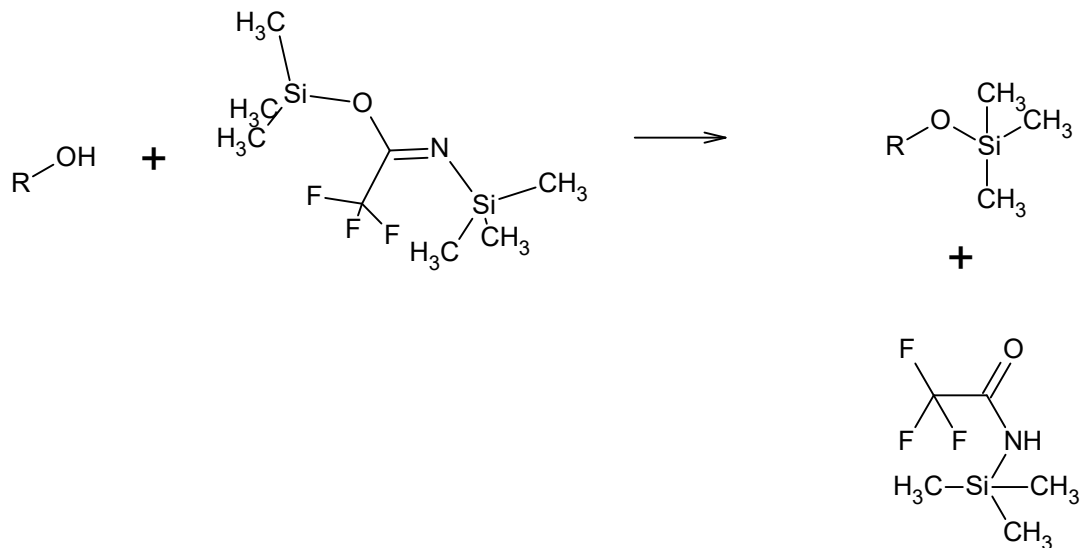


Figura 11. Esquema de la reacción de derivatización entre un alcohol y BSTFA. R= fragmento molecular D-pinitol y o Myo-inositol.

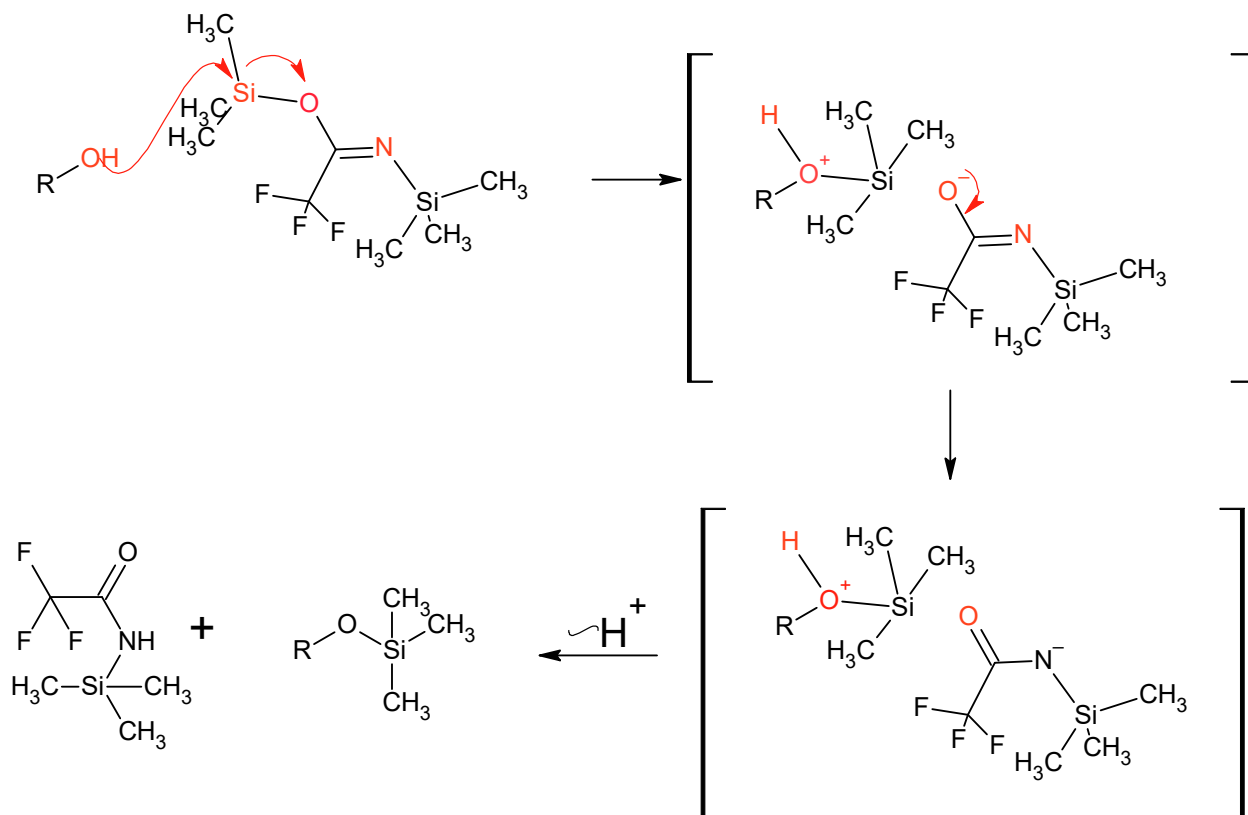


Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto entre un alcohol y derivatizante BSTFA. R= fragmento molecular D-pinitol y o Myo-inositol.





7.5 Condiciones de separación cromatográfica y de cuantificación por monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

La propuesta consistió en la determinación de D-Pinitol y myo-inositol por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa utilizando la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). El procedimiento se adecuó para el análisis de biomasa liofilizada de germinados de alfalfa, obtenida bajo diferentes condiciones de crecimiento.

Para ajuste de parámetros instrumentales, se trabajó con una solución de mezcla de estándares de D-pinitol y Myo-inositol, resorcinol y resveratrol; estos dos últimos como candidatos de estándar interno, las concentraciones de cada estándar en la mezcla fueron de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. En esta solución se llevó a cabo la reacción de derivatización; como primer paso se evaporó a sequedad utilizando el evaporador Speed Vac en la modalidad acuoso a 60°C durante 2 horas, posteriormente se adicionaron 475 μL de piridina y 25 μL de N, O bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). La reacción de sililación se llevó a cabo a 60°C durante 1 hr. Después de la derivatización, la muestra fue centrifugada a 10000 g durante 10 min para su inyección en el sistema de GC-TQ-MS. En el análisis instrumental, se utilizó el cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, modelo Bruker Scion TQ 456-GC. El desarrollo del método comenzó con la adquisición de datos espectrales en modo Full Scan en el intervalo de m/z 100- 500, examinando diferentes gradientes de temperatura. Las condiciones finales de separación cromatográfica y de detección se presentan en la Tabla 17.





Tabla 17. Parámetros instrumentales de GC-MS/MS para la determinación de D-pinitol y Myo-inositol.

GC-MS/MS, MRM			
Condiciones	Bruker SCIÓN SCION TQ MS		
Volumen de inyección	1 μ L		
Split	1:5 en el primer minuto		
Temp. de inyector	250 °C		
Flujo de gas acarreador	1 mL/min He		
Columna	DB-5MS; longitud de 30 m, 0.25 mm ID; 0.25 μ m de recubrimiento		
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temp(°C)	Permanencia (min)
	-	100	2
	12	300	6
Tiempo total	24.6 min		
Tem. De fuente de iónización	250 °C		
Modo de adquisición	Full Scan, Product, MRM		
Temp. De línea de transferencia	280 °C		
Tiempo de integración	100 ms		

Los picos en cromatogramas fueron asignados con base en los índices de retención y espectros de masas (Bibliotecas NIST/Wiley), así como mediante las inyecciones de cada estándar de manera individual. Los tiempos de retención asignados a las señales correspondientes a cada estándar fueron 7.48 min para resorcinol, 11.87 min para D-pinitol, 14.03 min para myo-inositol y 18.4 min para resveratrol. El tiempo total de la corrida cromatográfica fue de 22.5 min. En la figura 13 se presenta un ejemplo de cromatograma TIC de la mezcla de estándares adquirido en la modalidad de Full Scan, donde se indican las señales asignadas a cada compuesto.



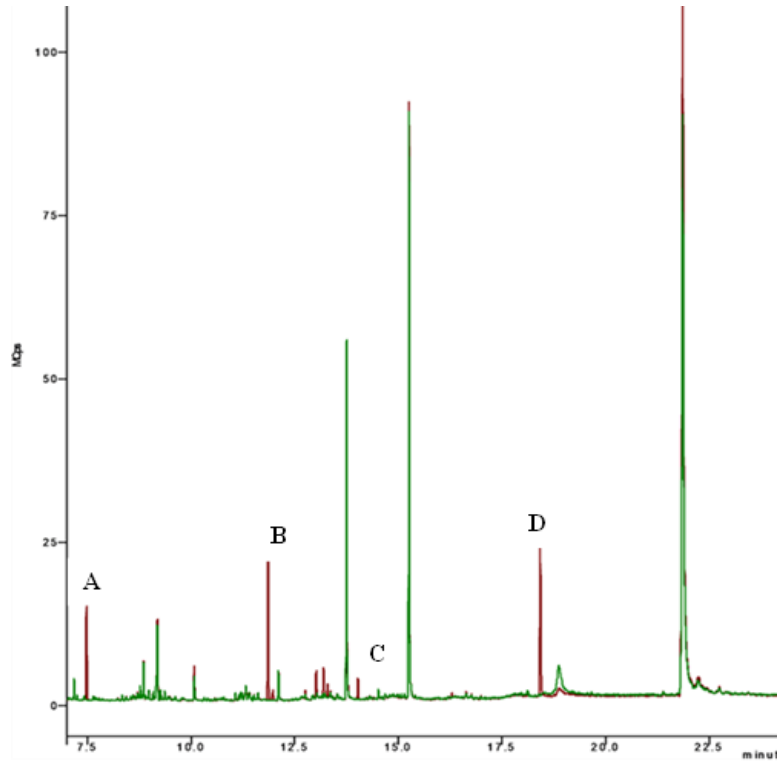


Figura 13. Típico cromatograma obtenido en el modo Full Scan de un mix de estándares (-) y un blanco derivatizado (-), A) Resorcinol 7.48 min, B) D-pinitol 8.55 min, C) Myo-inositol 14.03 min y D) resveratrol 18.4 min.

En las figuras 14 y 15 se muestran los espectros de masas D-pinitol y myo-inositol obtenidos experimentalmente en la modalidad full scan, comparados con los respectivos espectros de la biblioteca NIST

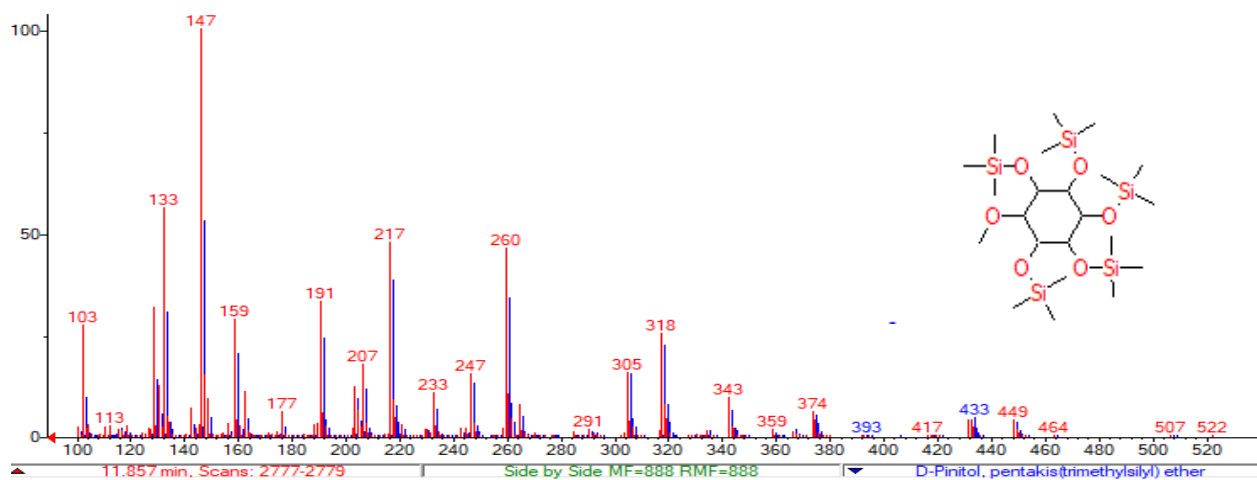


Figura 14. Espectro de masas D-pinitol experimental (rojo) y de biblioteca NIST (azul).



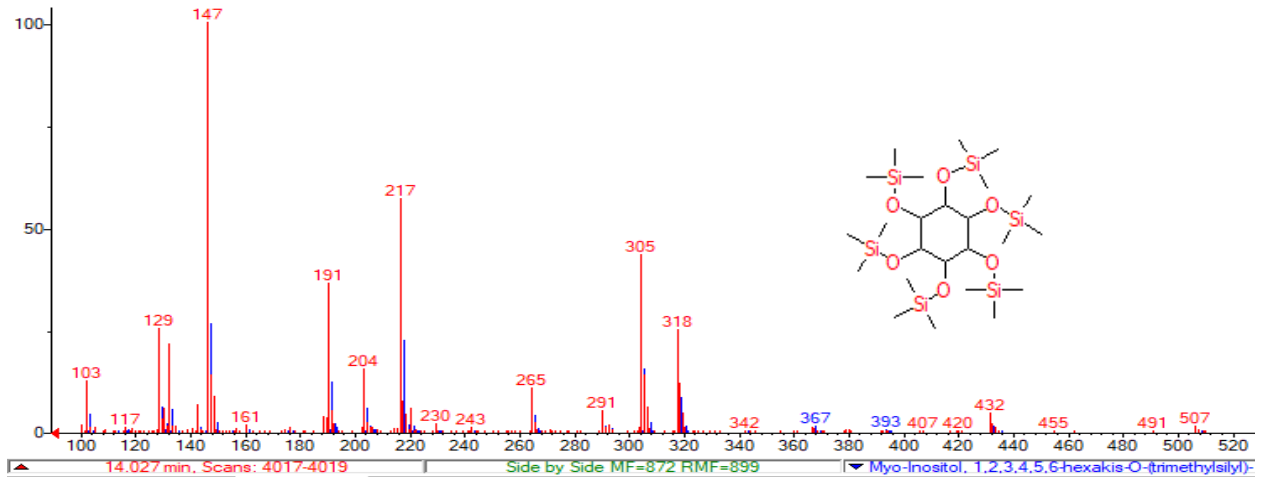


Figura 15. Espectro de masas *myo*-inositol experimental (rojo) y de biblioteca NIST (azul).

Con base en los espectros de masas anteriormente descritos, se seleccionaron los iones mayoritarios como potenciales precursores de cada analito para la cuantificación por MRM, los cuales se presentan en la Tabla (18).

Tabla 18. Iones precursores y producto seleccionados para cada analito.

	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)
Resorcinol	239	133, 147
	254	143, 239
D-pinitol	260	217, 245
	318	147, 215
Myo-inositol	265	147
	305	217
Resveratrol	444	191, 253

Los espectros de fragmentación de los iones precursores se obtuvieron empleando la modalidad de monitoreo de productos de fragmentación de iones precursores (Products). A partir de los espectros MS/MS, para cada uno de los iones precursores se eligió uno o más iones de mayor intensidad posible, para utilizarlos como iones cuantificadores, los cuales se presentan en la Tabla (18). Un parámetro que se estableció fue la energía de ionización de la zona CID para la obtención del mayor valor de relación señal/ruido (S/N) del ion cuantificador y por lo tanto el más bajo límite de detección posible. A partir de esto, se estudió de manera sistemática el efecto de la energía de fragmentación sobre la intensidad de los iones producto, el rango de energía evaluado fue de 5.0 – 20 eV, los resultados se presentan en la Figura 16.



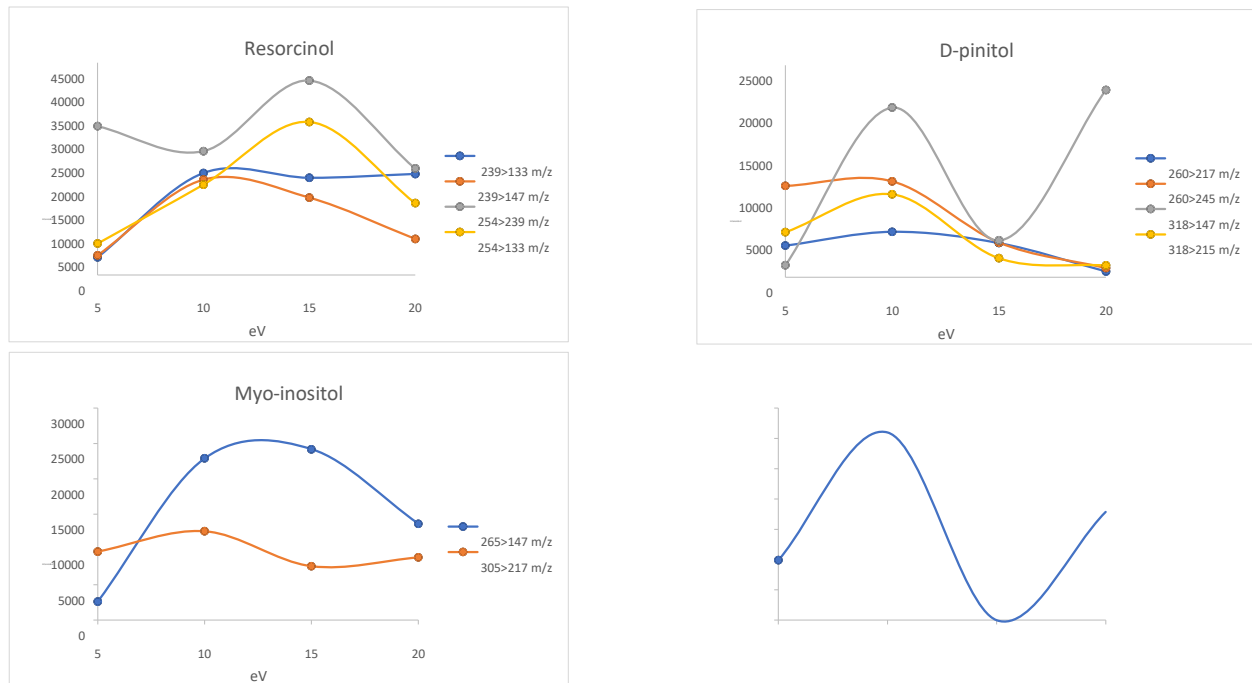


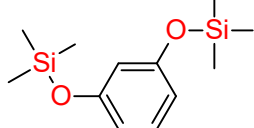
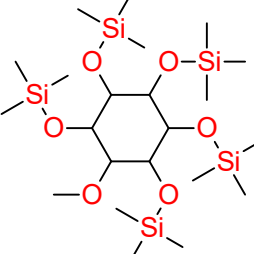
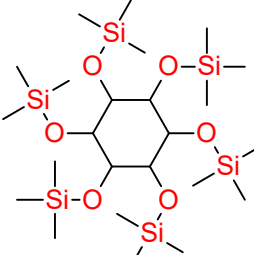
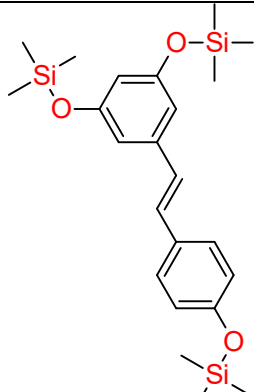
Figura 16. Efecto de la energía de fragmentación sobre abundancia de los iones producto para transiciones de cuatro compuestos de interés.

Las transiciones seleccionadas para cada compuesto fueron: resorcinol 254→239 y 254→133; D-pinitol 260→245 y 318→147; myo-inositol 265→147 y 305→217 y resveratrol 444→191 y 444→235.

Con base en estos resultados, se seleccionaron los valores de energía para cada compuesto, los cuales se presentan en la Tabla 19; en la misma Tabla se incluyen también los valores de m/z de iones precursores, cuantificadores y calificadores. El ion 147 m/z fue el seleccionado como cuantificador para myo-inositol y D-pinitol, mientras que los iones m/z 217 y 245 se eligieron respectivamente, como iones calificadores, para confirmar su identidad.



Tabla 19. Lista de cuatro compuestos seleccionados para el análisis GC-MS/MS, estructura y masa molecular (MM) de sus derivados, valores m/z de iones precursoros (IP) y iones producto (cualificador (Q) y cuantificador (C) con su respectiva energía de fragmentación.

Compuesto	Estructura	MM, Da	IP m/z	Ip m/z	Energía de collision, eV	Ion (Q, C)
Resorcinol		254.47	254	133	15	C
D-pinitol		555.08	260	245	10	Q
			318	147	20	C
Myo-inositol		613.24	305	217	10	Q
			265	147	15	C
Resveratrol		444.78	444	191	10	C





En la Tabla 20 se definen los segmentos de tiempo en el cromatograma y las transiciones ion precursor (IP) → ion cuantificador (C) para la adquisición de las señales de cuatro compuestos en el modo MRM.

Tabla 20. Condiciones seleccionadas para el modo MRM de adquisición de señales en GC-MS/MS instrumentales para MRM seccionado en segmentos estructurales y sus respectivos tiempos de retención y su DE.

compuesto	TR min	Segmento	Tiempo min	IP→C	Ventana de Tiempo
Resorcinol	7.48 ± 0.01	1	7.0 - 8.0	254→133	1.0
D-pinitol	11.85 ± 0.01	2	11.3 -12.3	318→147	1.0
Myo-inositol	14.04 ± 0.01	3	13.5 -14.5	265→147	1.0
Resveratrol	18.40 ± 0.01	4	17.9 -18.9	444→191	1.0

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y de MRM se procedió a realizar el proceso de calibración. En cuanto al estándar interno, para resorcinol no se logró ningún mejoramiento en la precisión y en la linealidad de las funciones de calibración, mientras resveratrol resultó ser un estándar interno adecuado para este análisis. Desafortunadamente, no se pudo comprar este reactivo durante el desarrollo de la tesis, por lo que se siguió con las determinaciones utilizando directamente señales de D-pinitol y myo-inositol, sin su normalización por estándar interno.



7.6 Calibración

Para la calibración externa se utilizaron 8 soluciones estándar de que contenían 0, 30, 70, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los compuestos D-pinitol y Myo-inositol. En la Figura 17 se presentan los cromatogramas MRM sobrepuestos de todas las soluciones de calibración para los dos ciclitoles. Cabe mencionar que a todas las soluciones se adicionó resorcinol en una concentración final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, pero tal como ya se mencionó antes, este compuesto resultó ser un estándar interno adecuado.

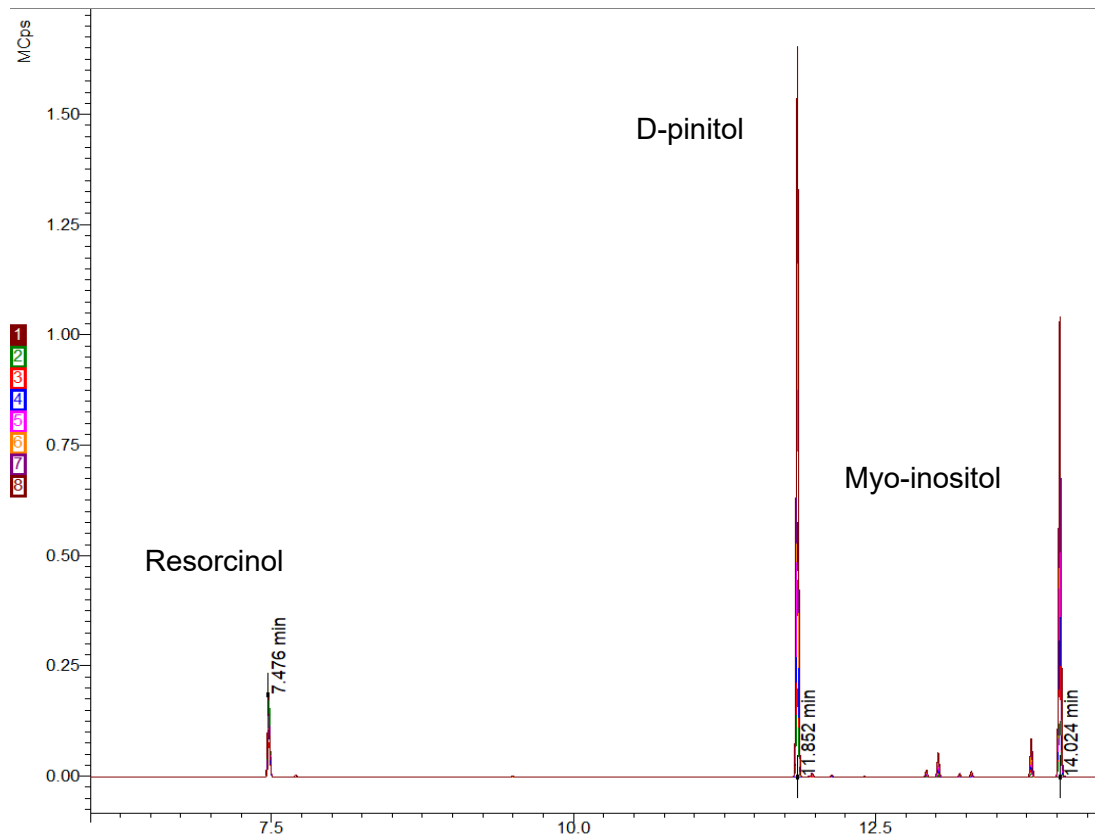


Figura 17. Cromatogramas MRM de las 8 soluciones de estándar de 0-300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los compuestos D-pinitol y Myo-inositol, así como el estándar interno resorcinol en 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

En la Figura 17 se presenta un acercamiento de las secciones de los mismos cromatogramas correspondientes a la elución myo-inositol y D-pinitol, transiciones m/z 318 \rightarrow 147 y 265 \rightarrow 147, respectivamente. Para obtener las funciones de calibración se utilizó el programa MS Workstation de Bruker. Las ecuaciones obtenidas por regresión lineal para cada analito obtenidas se presentan en la Tabla 21.



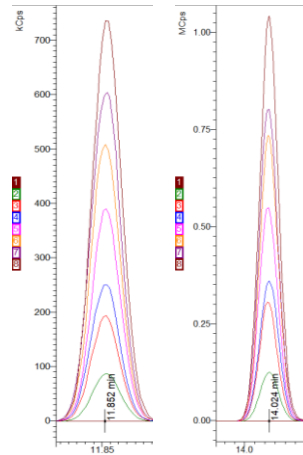


Figura 18. Acercamiento de las secciones de cromatogramas presentados en la Fig. 17, correspondientes a señales de D-pinitol (11.85 min) y Myo-inositol (14.02 min); concentraciones de ambos analitos 30-300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para evaluar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método, se hizo la lectura de 5 blancos y, con base en los valores obtenidos, se calculó la desviación estándar. Utilizando el criterio de tres y diez desviaciones estándar para LD y LC, respectivamente, los valores obtenidos fueron de 1.4 ng mL^{-1} y 4.8 ng mL^{-1} , para D- pinitol y 2.8 ng mL^{-1} y 9.3 ng mL^{-1} (Tabla 21).

Tabla 21. parámetros analíticos obtenidos del proceso de calibración externa.

Compuesto	LD ng mL^{-1}	LC ng mL^{-1}	Función de calibración	R ²
D-pinitol	1.4	4.8	$\text{cps}=57.85\text{c}+391$	0.9992
Myo-inositol.	2.8	9.3	$\text{cps}=189.4\text{c}-310$	0.9994

Para evaluar la exactitud del método se realizó un experimento de recobro mediante la adición de estándar de D-pinitol a cada una de las seis muestras enlistadas en la Tabla 22, para obtener la concentración de este estándar en la solución final de 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla (22)).





Tabla 22. Porcentajes de recuperación de D-pinitol, los análisis son de duplicados analíticos a los cuales se les adición $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de estándar D-pinitol.

Muestra, condiciones de estrés	Concentración sin adición $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentración con adición $\mu\text{g L}^{-1}$	%R
Cr (VI), 5.0 mg L^{-1}	$3.12 \pm$	$4.83 \pm$	86
Cr (VI), 10 mg L^{-1}	$2.01 \pm$	$4.45 \pm$	99
Na(I), 5.0 mg L^{-1}	$2.96 \pm$	$4.65 \pm$	85
Na(I), 10 mg L^{-1}	$2.47 \pm$	$5.77 \pm$	116
Se (IV), 3.5 mg L^{-1}	$2.73 \pm$	$5.59 \pm$	107
Se (IV), 5.0 mg L^{-1}	$2.53 \pm$	$4.19 \pm$	83

Los porcentajes de recuperación van de 86% a 116 % lo que indica una aceptable exactitud del procedimiento desarrollado. Una vez establecidos los parámetros analíticos del método, se procedió al análisis de muestras reales.

7.8 Determinación de ciclitoles en biomasa

La extracción de los ciclitoles se realizó a partir de 50 mg de biomasa liofilizada a la cual se adicionó 1.5 mL MeOH 80%. Las muestras fueron sonicadas por 30 min y posteriormente centrifugadas a 10000 g por 15 min, se tomaron 500 μL de sobrenadante y se evaporaron a sequedad en Speed vac a 60°C , Para la derivatización, la muestra fue resuspendida con 475 μL de piridina, posteriormente se adicionó 25 μL de N, O bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). La reacción de sililación se llevó a cabo a 60°C durante 1 hr. Después de la derivatización, la muestra fue centrifugada a 10000 g durante 10 min para su inyección en el sistema de GC-TQ-MS/MS. Las muestras fueron analizadas por triplicado. En la Figura (19) se presenta un ejemplo de cromatograma MRM de una muestra real.



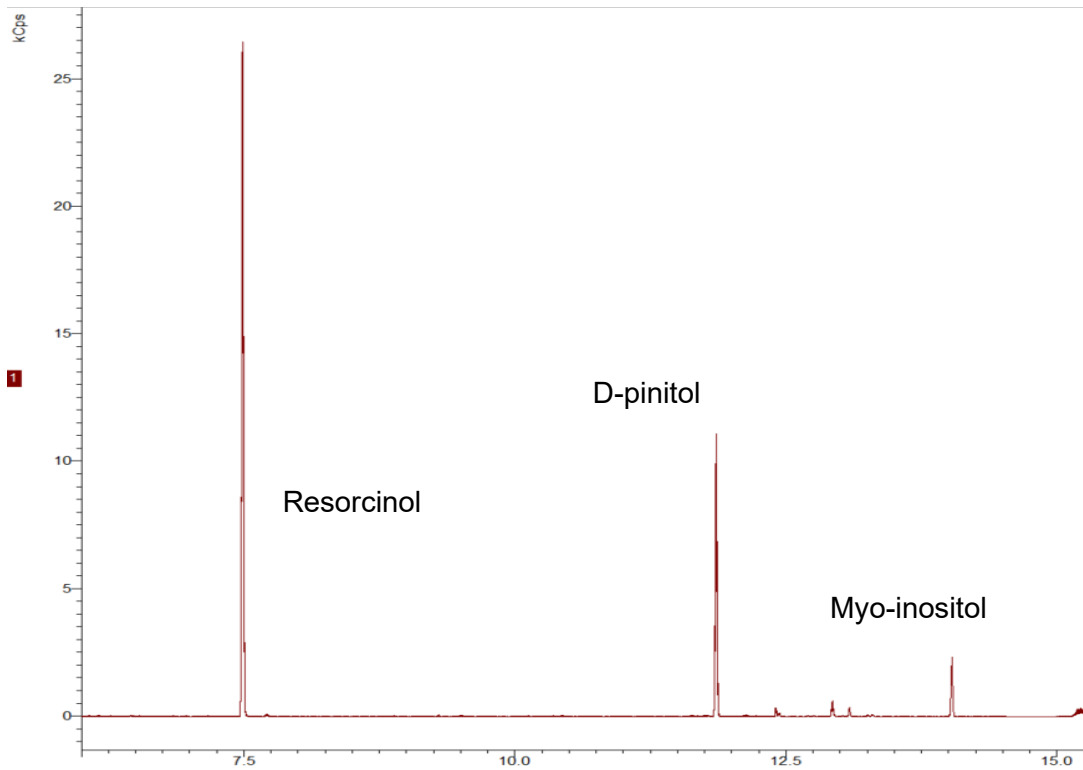


Figura 19. Cromatograma MRM de una muestra real - plántulas crecidas en exposición a 10 mg L^{-1} de Na en el medio.

En la Tabla 23 se presentan el promedio con respectivo valor de desviación estándar, obtenidos para cada tratamiento en base a tres replicas. Los valores encontrados en biomasa para D-pinitol van de 1.70 a $3.10 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$, mientras que para Myo-inositol el rango determinado fue de 0.51 a $1.0 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$.





Tabla 23. Concentraciones de D-pinitol y Myo inositol encontradas en plántulas de alfalfa expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI), NaCl y Se (IV).

Agente estrasante	Concentración del estresante en el medio, mg L ⁻¹	D-pinitol ± DE, µg mg ⁻¹	Myo-inositol ± DE, µg mg ⁻¹
Cr (VI)	0	1.70 ± 0.08	0.60 ± 0.04
	0.5	2.35 ± 0.07	0.71 ± 0.02
	3.0	2.71 ± 0.01	0.51 ± 0.04
	5.0	2.93 ± 0.03	0.67 ± 0.03
	10	3.10 ± 0.09	0.82 ± 0.03
NaCl	0.5	2.57 ± 0.01	0.63 ± 0.05
	3.0	3.01 ± 0.02	0.84 ± 0.03
	5.0	2.96 ± 0.06	0.97 ± 0.02
	10	2.47 ± 0.06	1.00 ± 0.01
Se (IV)	0.5	2.65 ± 0.04	0.93 ± 0.04
	2.0	1.86 ± 0.04	0.65 ± 0.01
	3.5	2.73 ± 0.02	0.93 ± 0.03
	5.0	2.53 ± 0.01	0.88 ± 0.04

En esta Tabla a simple vista se observa que, las crecientes concentraciones de Cr (VI) en medio causaron un aumento gradual de la concentración de D-pinitol respecto al tratamiento control, mientras que la concentración de myo-inositol se vio menos afectada por este agente estresante, observándose el aumento solamente para la más alta concentración de 10 mg Cr (VI) L⁻¹.

Para el NaCl, su presencia en cualquier concentración examinada en este trabajo provocó un aumento de ambos ciclitoles en la biomasa en comparación con el cultivo control. Cabe mencionar que la más alta concentración de D-pinitol correspondió a la condición de 3.0 mg L⁻¹ de Na en medio, mientras que para myo-inositol, su concentración incrementaba paulatinamente con el aumento de concentración de estresante en el medio en todo el intervalo examinado.

Por último, para diferentes concentraciones de Se(IV) como el agente estresante, los cambios en las concentraciones de D-pinitol y myo-inositol presentaron la misma tendencia; se observa un aumento de ambos ciclitoles en presencia de la concentración más baja de Se(IV) (0.5 respecto al control, la tendencia creciente es también clara para concentraciones de selenio 3.5 y 5.0 mg L⁻¹, pero en la condición de 2.0 mg L⁻¹ hay una disminución del contenido de ambos compuestos respecto a las demás concentraciones de este estresante.

Para una mejor comprensión del efecto de los estresantes estudiados en las plántulas de alfalfa, se integraron todos de los resultados obtenidos (biomasa, concentraciones de metales/metaloideos, valores BCF y concentraciones de dos ciclitoles) para su análisis.



7.9 Integración e interpretación de resultados

Los resultados obtenidos en el análisis de plántulas de alfalfa y presentados en las secciones anteriores abarcan: la cantidad de biomasa, concentraciones de diez elementos y de dos ciclitoles. Estos datos fueron obtenidos para tres agentes estresantes utilizando cinco diferentes concentraciones de cada uno de ellos en medio de crecimiento. Con esta grande cantidad de datos de alta dimensionalidad, resulta difícil evaluar comparativamente efectos específicos de cada uno de los estresantes, dependiendo de su concentración empleada. Es por ello, que el análisis de datos se realizó de manera individual para cada uno de los estresantes. En primer lugar, se integraron en un solo gráfico los cambios de biomasa, BFC y de concentraciones de dos ciclitoles en función de creciente concentración del agente estresante (Figuras 20, 22 y 24). En segundo lugar, para disminuir la dimensionalidad y observar mejor la estructura de los datos, se llevó a cabo el análisis multivariante incluyendo además concentraciones de diez elementos. Se seleccionó el método de análisis de componentes principales (PCA – principal component analysis, por sus siglas en inglés) y se utilizó el paquete de software The Unscrambler 7.0 (CAMO). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 21, 23 y 25, respectivamente.

7.9.1 Efecto de Cr (VI)

En la Figura 20 se integran cambios de biomasa, BCF y de dos ciclitoles para crecientes concentraciones de Cr (VI) en medio. Considerando el crecimiento de plántulas, la concentración benéfica del agente estresante es entre 0.5 y 3.0 mg L⁻¹, con ligera inhibición de crecimiento a partir de 5.0 mg L⁻¹. En cuanto a los niveles de ciclitoles, sus concentraciones más altas corresponden a 3.0 mg L⁻¹ de cromo en medio. Considerando que la captación de Cr es baja en todas condiciones de exposición a Cr (VI) examinadas, parece que la condición de 3.0 mg L⁻¹ Cr es la más favorable, ya que asegura un aumento en la síntesis de ciclitoles sin sacrificar la producción de biomasa y sin acumulación de Cr.

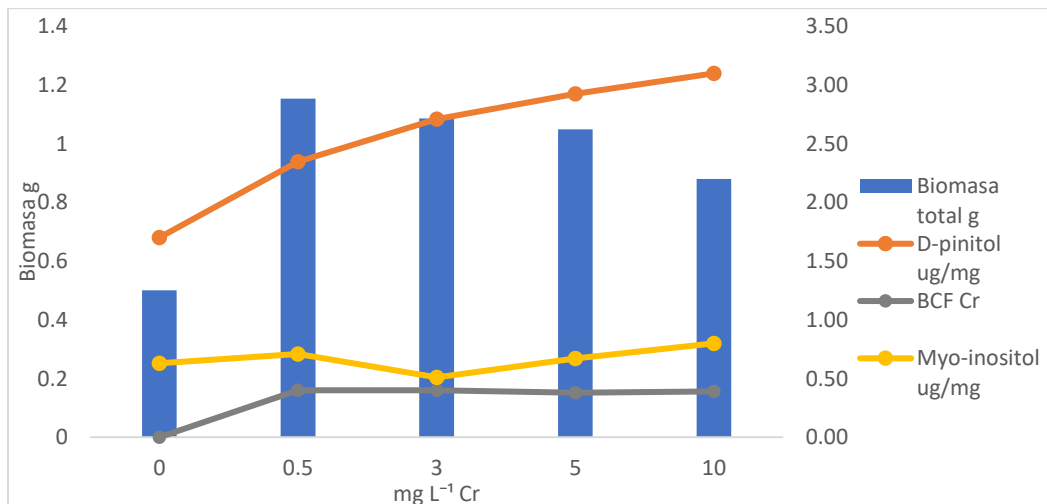


Figura 20. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Cr (VI) sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.



El modelo PCA obtenido para plantas expuestas a Cr (VI) y plantas controles no-expuestas se presenta en la Figura 21. Como se puede observar, los dos primeros componentes principales describen 85% de la variabilidad total de los datos, lo que confirma la significancia estadística del modelo. En el gráfico de “scores”, el modelo ordena las muestras de acuerdo con la concentración de Cr (VI) en el medio. En el gráfico de “loadings”, en las mismas coordinadas de dos primeros componentes principales, se obtiene la distribución de variables descriptivas. De acuerdo con la Figura 20, la producción de biomasa se asocia directamente con la exposición a 3.5-5.0 mg L⁻¹ de cromo. Asimismo, está clara la tendencia creciente de las concentraciones de ciclitoles con aumento de Cr (VI) en el medio. En cuanto a perfil ionómico, más altas concentraciones de Mg, K y Ca se asocian con las plantas control, mientras que a captación de Zn, Mo, Cu y Na se ven favorecidos en presencia de Cr (VI). De manera general, la exposición a Cr (VI) en el intervalo de sus concentraciones 0.5 – 3.0 mg L⁻¹ no causa la acumulación de cromo (BCF aprox. 0.4), pero favorece la producción biomasa, de los dos ciclitoles y también favorece la captación de micronutrientes minerales Zn, Mo y Cu en plántulas de alfalfa. Los resultados obtenidos para Cr (VI) son inesperados y sorprendentes, debido a la conocida toxicidad de Cr (VI). La presencia de Cr (VI) en los cultivos es sin duda no deseable y este agente estresante se incluyó en el estudio solamente para fines comparativos. La no-acumulación de cromo en biomasa, el efecto promotor de bajas concentraciones en el crecimiento y en captación de algunos micronutrientes minerales sugiere fuertemente la reducción de Cr (VI) a Cr (III) en el medio de cultivo. Dicha reducción podría ser estimulada por algunos componentes del medio de crecimiento, así como por los exudados antioxidantes de la planta. En un trabajo futuro, es necesario repetir experimentos y planear experimentos adicionales enfocándose en la posible reducción de Cr (VI).

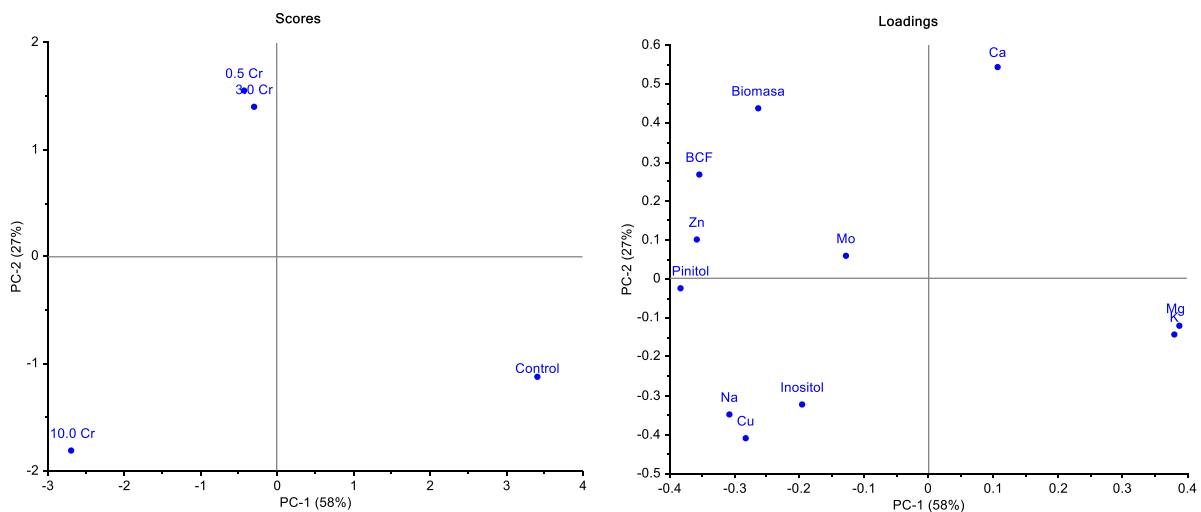


Figura 21. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de Cr (VI).



7.9.2 Efecto de NaCl plántula

De acuerdo con la Figura 22, para el caso del NaCl la producción de biomasa y la concentración de myo-inositol se vieron favorecidas en presencia de 3.0 - 10 mg L⁻¹ de la sal en medio, mientras que la síntesis del D-pinitol era más eficiente para concentraciones del estresante 3.0-5.0 mg L⁻¹. El BCF para sodio varía entre los tratamientos, siendo el más bajo valor (0.4) encontrado para 3 mg L⁻¹ de sal en medio y el más alto (>1) correspondió a la más baja concentración de la sal.

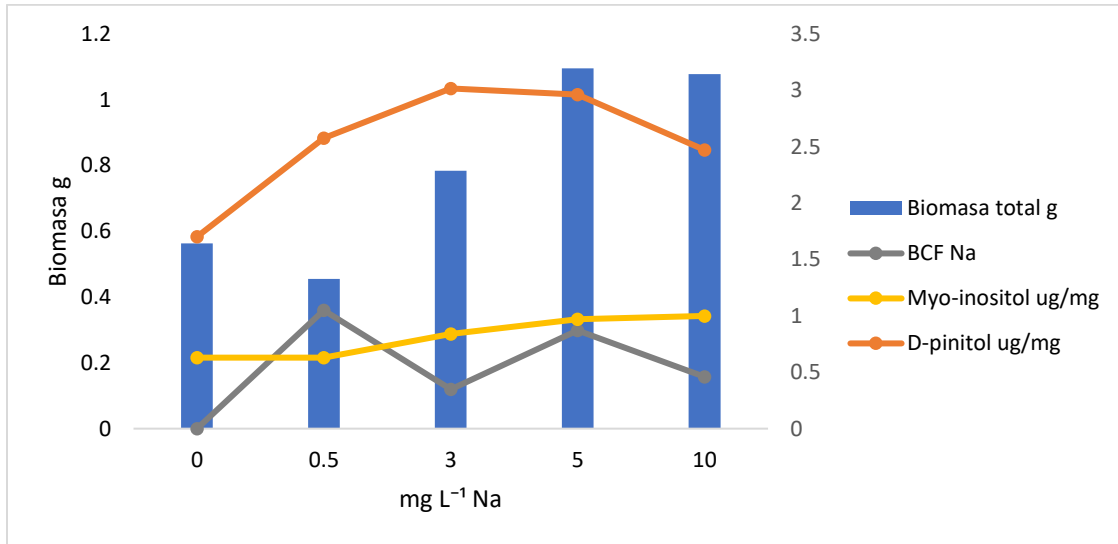


Figura 22. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de NaCl sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.

El modelo PCA obtenido para alfalfa bajo exposición a NaCl se presenta en la Figura 23, su significancia estadística queda demostrada debido a que los dos primeros componentes principales describen 88% de una varianza total de los datos. De manera similar como en el caso de Cr (VI), el modelo ordena las muestras de acuerdo con creciente concentración del agente estresante en el medio (grafico de "scores"). En el gráfico de "loadings" se observa que prácticamente todas las variables medidas se asocian con cultivos crecidos en presencia de la sal y solamente la captación de Mg se ve deteriorada en condiciones de estrés salino.



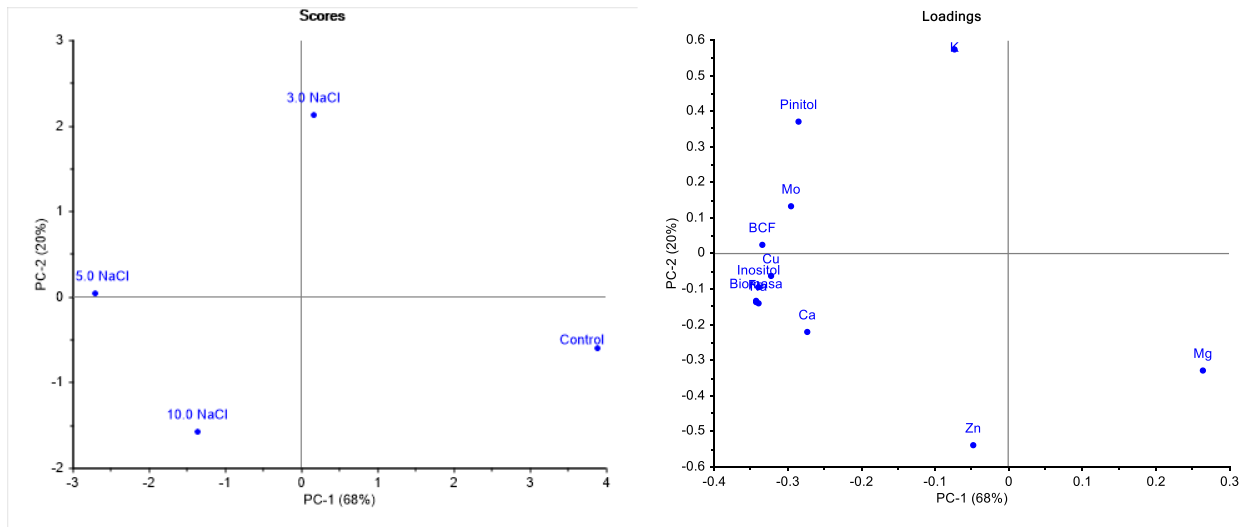


Figura 23. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de NaCl.

Aunque de manera general el estrés salino es perjudicial para las plantas, existen reportes sobre la buena tolerancia de alfalfa bajo exposición a este agente estresante⁷⁰ y los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que la sal podría tener efectos benéficos sobre el crecimiento y el contenido tanto de ciclitoles como de algunos micronutrientes minerales en esta planta. En particular, entre las concentraciones de la sal estudiadas, la de 3.0 mg L⁻¹ permitió obtener la mejor producción de biomasa, de los dos ciclitoles y también promovió la captación de Cu, Ca y Mo manteniendo el valor de BCF para sodio de 0.35. La sal (NaCl) se seleccionó en este estudio para comparar sus efectos en alfalfa contra otros dos agentes estresantes, pero parece que bajo ciertas condiciones la aplicación de la sal podría recomendarse para mejorar la composición de este importante forraje.



7.9.3 Efecto de Se (IV)

Para el caso de Se, de acuerdo con los resultados integrados en la figura 24, su presencia provee un mejor crecimiento y más altas concentraciones de ciclitoles en plántulas de alfalfa en comparación con condiciones controles. Específicamente, la concentración de 2 mg L⁻¹ en medio resultó ser la más benéfica para la producción de biomasa mientras que la síntesis de ciclitoles y el aumento de BCF fueron asociados con las concentraciones de 0.5, 3.5 y 5.0 mgSe L⁻¹. Englobando las variables incluidas en la Figura 24, la exposición a 3.5 mg L⁻¹ de selenio parece ser la más favorable para la composición de las plántulas en términos de este trabajo de tesis.

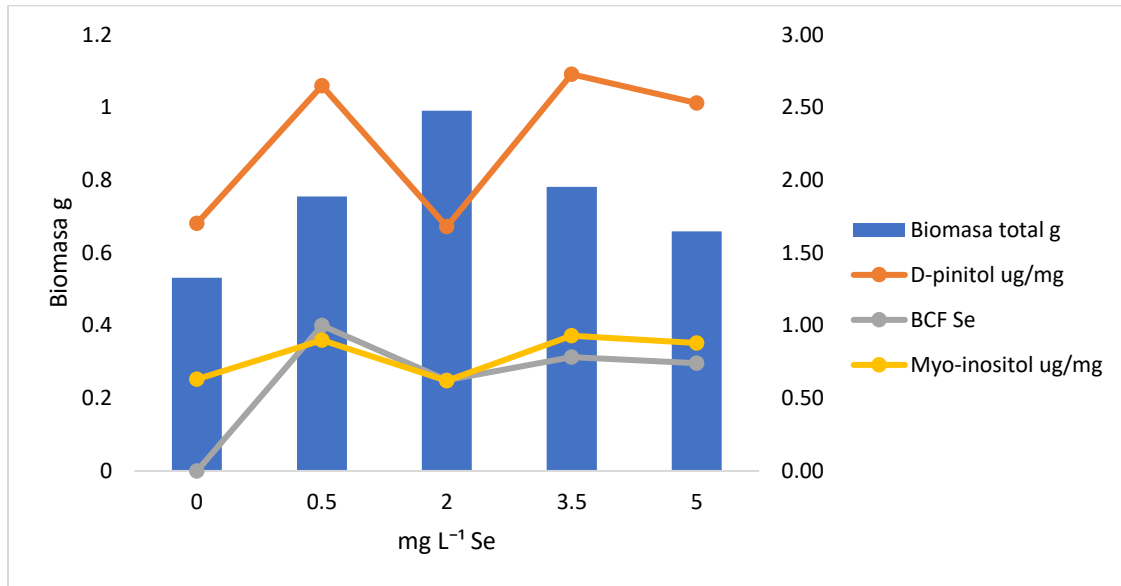


Figura 24. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Se (IV) sobre la producción de biomasa, BCF y la síntesis de dos ciclitoles en plántulas de alfalfa.

En el modelo PCA obtenido para plántulas expuestas a Se (IV), los dos primeros componentes principales describen 81% de la varianza total de los datos, entonces este modelo también es estadísticamente significativo. La distribución de muestras, dependiendo de la concentración de selenio en el medio, y la distribución de variables en coordenadas de dos primeros componentes principales se presentan en el gráfico de "scores" y de "loadings", respectivamente. En este caso, se observan claramente agrupaciones de variables con cada una de las condiciones de exposición. En particular, las concentraciones entre 2.0 y 3.5 mg L⁻¹ de selenio en el medio, favorecieron el crecimiento de las plántulas, la captación de Se, Fe, Cu y Zn y también la producción de ciclitoles. La ausencia de Se en el medio parece ser asociada con una preferencial captación de Mg, mientras que bajas concentraciones del estresante favorecen la toma de Mo, K y Ca. Es de notar que los datos correspondientes a cultivo expuesto a 5 mg L⁻¹ de Se fueron eliminados del análisis PCA, porque esta muestra no permitía obtener un modelo estadísticamente significativo (< 60% de variabilidad de datos). Como se puede observar en la Figura 25, para esta más alta concentración de Se, todas las variables presentaron tendencia de disminuir, sugiriendo el inicio de la fitotoxicidad.



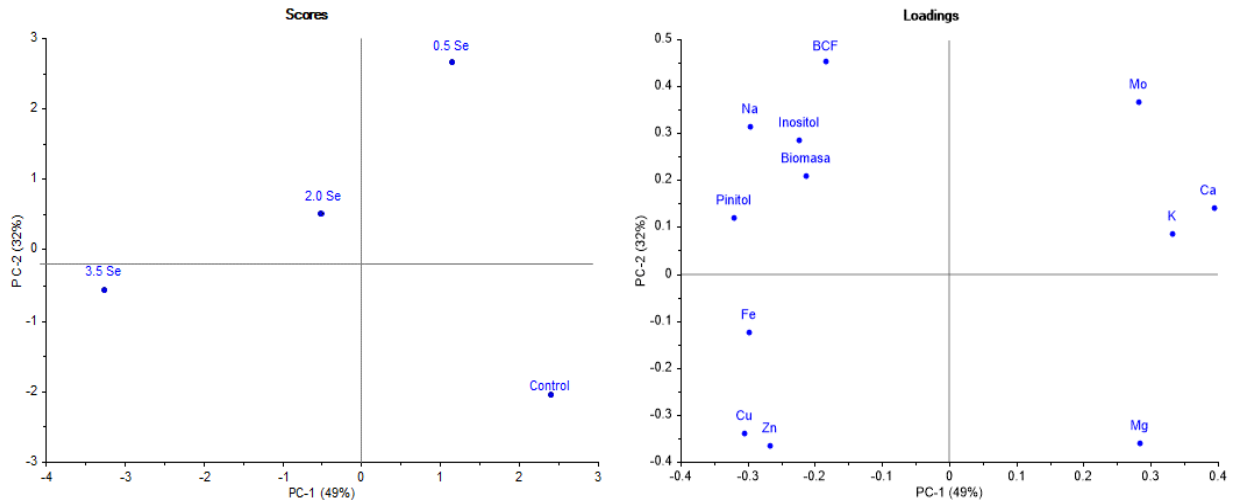


Figura 25. Modelo PCA obtenido utilizando todas variables medidas en plántulas de alfalfa bajo exposición a diferentes concentraciones de Se (IV).

El selenio es un elemento benéfico para todas formas de la vida, entonces tanto su captación como aumento de producción de biomasa y de ciclitoles es de interés cuando se pretende mejorar la calidad nutricional de alfalfa. En el sistema experimental utilizado en este trabajo, se podría recomendar la concentración de 3.5 mg L^{-1} de selenio en forma de Se (IV) para lograr el mejor efecto.

Se ha comentado antes que el myo-inositol es el sustrato para la biosíntesis de D-pinitol, que dicha síntesis ocurre mediante metilación catalizada por metiltransferasas y que podría esperarse un efecto promotor de selenio y posiblemente algunos otros metaloides y metales en esta transformación. Se evaluó la relación entre concentraciones de D-pinitol y suma de myo-inositol + D-pinitol ($P/(I+P)$) en cada una de las muestras para cada uno de los agentes estresantes. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 26-28. De manera importante, la presencia de cada uno de los tres agentes estresantes aparentemente promovió la formación de D-pinitol respecto a la concentración de ambos ciclitoles en biomasa; sin embargo, los cambios de la relación $P/(I+P)$ dependieron del tipo y de la concentración del estresante. En el caso de Se (IV), se observaron cambios relativamente pequeños, siendo la concentración de 3.5 mg L^{-1} de selenio en medio la más favorable (Fig. 26). Es interesante que el más grande incremento de D-pinitol respecto a los dos ciclitoles fue observado en presencia de 3.0 mg L^{-1} cromo en forma de Cr (VI) (Fig. 28). Como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos para Cr (VI) fueron sorprendentes ya que este agente tóxico aparentemente mejoraba varios de los parámetros evaluados en este estudio; los efectos inesperados podrían deberse a la reducción de Cr (VI) a Cr (III) en el medio de cultivo y este punto requiere de un estudio más profundo en futuro. En el caso de NaCl, el más notable incremento de la relación $P/(I+P)$ correspondió a su baja concentración en medio. Crecientes concentraciones de NaCl causaron paulatina disminución de la síntesis de D-pinitol a partir de myo-inositol (Fig. 27).



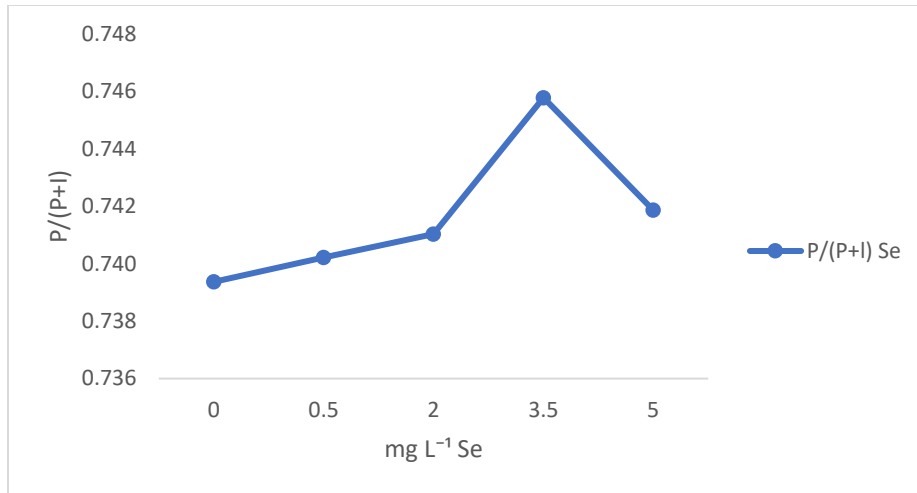


Figura 26. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con selenito.

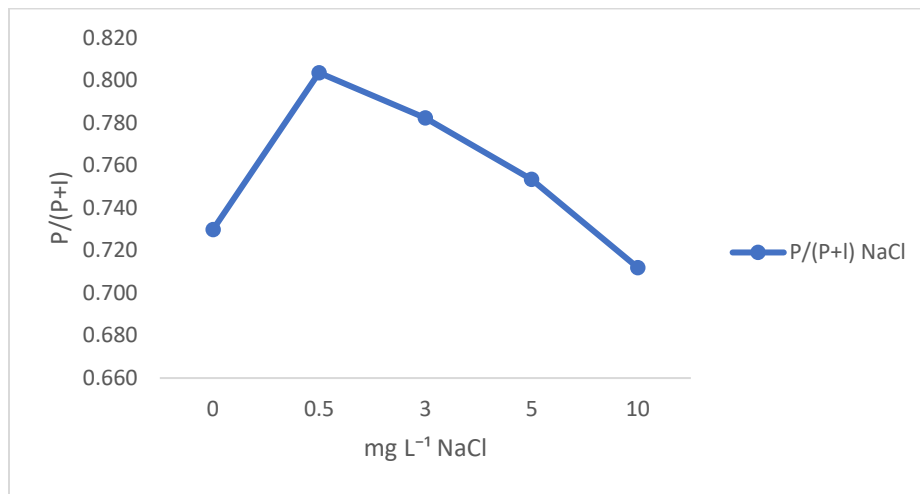


Figura 27. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con cloruro de sodio.

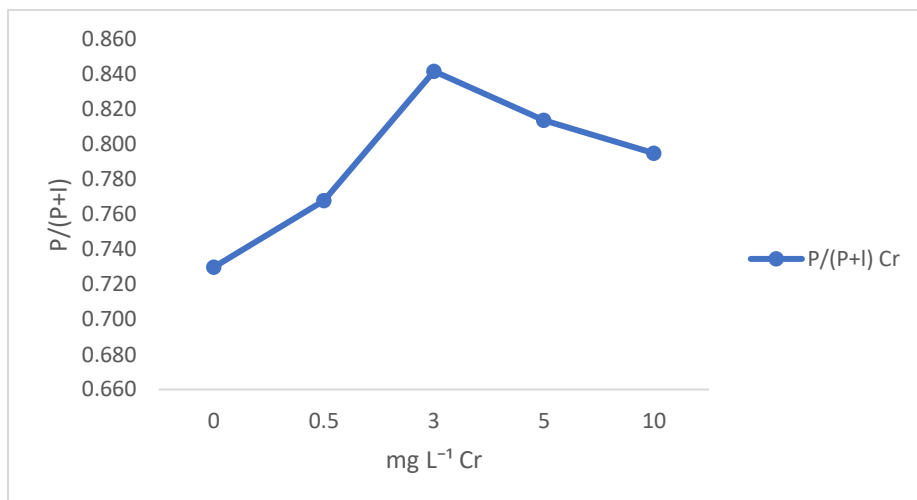


Figura 28. Relación entre los ciclitoles D-pinitol y myo-inositol para las muestras crecidas con dicromato.





En base a la integración de los resultados y la discusión que se acaba de presentar, las más favorables condiciones de exposición para cada uno de los tres agentes estresantes fueron: 3.5 mg L⁻¹ para selenio en forma de Se (IV), 3.0 mg L⁻¹ para NaCl y 3.0 mg L⁻¹ de cromo en forma de Cr (VI). En la Tabla 24 se presentan valores de todos parámetros evaluados en el estudio para estas tres condiciones de exposición de alfalfa comparándolos con el cultivo control.





Tabla 24. Comparación de parámetros obtenidos en condiciones de exposición a Se (IV), NaCl y Cr (VI) más favorables, respecto cultivo control.

Parámetro	control	Se (IV), 3.5 mg L ⁻¹	NaCl, 3.0 mg L ⁻¹	Cr (VI), 3.0 mg L ⁻¹
Biomasa mg	550 ± 22	800 ± 10	820 ± 10	1100 ± 16
BCF	-	0.73	0.35	0.40
Mg, mg g ⁻¹	6.71 ± 0.18	3.27 ± 0.23	3.00 ± 0.22	3.61 ± 0.25
Ca, mg g ⁻¹	5.02 ± 0.12	7.55 ± 0.08	7.28 ± 0.15	7.37 ± 0.08
Na, mg g ⁻¹	0.10 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.13 ± 0.01
K, mg g ⁻¹	25.5 ± 0.5	21.2 ± 0.6	30.2 ± 0.5	21.5 ± 0.2
Mo, µg g ⁻¹	55.5 ± 2.5	46.0 ± 2.0	64.0 ± 3.0	64.0 ± 3.0
Zn, µg g ⁻¹	45.0 ± 2.0	51.0 ± 2.4	43.0 ± 3.0	50.0 ± 2.0
Fe, µg g ⁻¹	84.0 ± 2.0	101 ± 3	102 ± 2	100 ± 2
Cu, µg g ⁻¹	11.0 ± 0.2	14.0 ± 0.8	14.0 ± 0.1	13.0 ± 2.0
D-pinitol (P), µg mg ⁻¹	1.70 ± 0.08	2.73 ± 0.02	3.01 ± 0.02	2.71 ± 0.01
Myo-inositol (I), µg mg ⁻¹	0.60 ± 0.04	0.93 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.51 ± 0.04
P/(I+P)	0.739	0.746	0.782	0.842

En primer lugar, es necesario resaltar que la producción de biomasa y la síntesis de ciclitoles se vieron favorecidas en presencia de cada uno de los tres agentes estresantes, lo que indica que el estrés abiótico activó el metabolismo en las plántulas de alfalfa como inmediata respuesta defensiva. El caso de Cr (VI) es muy intrigante debido a aparentemente benéficos efectos que causó su presencia. Se propuso que este agente tóxico podría ser reducido en el medio de crecimiento. Aunque la concentración de cromo en biomasa aumentaba conforme se incrementó la concentración de Cr (VI) en el medio, el factor BCF resultó ser bajo (0.4, Tabla 24) lo que es indicativo de la conversión de Cr (VI) a Cr (III) debido a que este segundo es mucho menos biodisponible.

La premisa del estudio era que el Se (IV) en alfalfa ejercería efectos claramente benéficos y más importantes en comparación con Cr (VI) y NaCl. Efectivamente, para selenio, su captación era la más efectiva, confirmando estudios anteriores donde se demostró que alfalfa tiene capacidad de acumular Se i convertirlo en especies orgánicas ^(29,32). Además de biofortificación de alfalfa con selenio, este elemento causó la mejor captación de Ca, Zn, Cu y Zn y también una menor





disminución de la concentración de Mg, respecto a otros agentes estresantes. Finalmente, la síntesis de myo-inositol se vio más fuertemente favorecida por el selenio y también se observó su más eficiente conversión en D-pinitol, comparando con el cultivo control.

En el caso de NaCl, los resultados indicaron el impacto favorable para su concentración de 3.0 mg L⁻¹ en el medio, de acuerdo con buena tolerancia de alfalfa a estrés salino, mencionada en varios puntos de la tesis (referencia).

En general, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la respuesta de alfalfa y efectos que ejercen en ella los agentes de estrés abiótico no siempre son perjudiciales; al contrario, en condiciones de estrés suave (Tabla 24), alfalfa activó mecanismos de defensa de tal manera que varios de los parámetros determinados mejoraron respecto al cultivo control.





8. Conclusiones

1. Se demostró la capacidad de geminación de alfalfa para crecer en presencia de Cr (VI) ($0.5-10 \text{ mg L}^{-1}$), Se (IV) ($0.5 - 5.0 \text{ mg L}^{-1}$) y NaCl ($0.5 -10 \text{ mg L}^{-1}$). En las plántulas de alfalfa crecidas con Se (IV) se observa un aumento de la cantidad de biomasa generada en las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg L^{-1} respecto al control, siendo la concentración de 2.0 mg L^{-1} donde muestra un máximo de crecimiento; aunque la biomasa generada en las concentraciones de 3.5 y 5.0 mg L^{-1} , para el caso de la exposición a Cr (VI) se observa un aumento significativo en todos los tratamientos con cromo respecto al tratamiento control. Por último, conforme aumenta la concentración del contenido de NaCl en el medio de crecimiento, aumenta la cantidad de biomasa generada, siendo las concentraciones de 5.0 y 10 mg L^{-1} de NaCl en donde se obtuvo la mayor cantidad de biomasa comparado con el control y los tratamientos de 0.5 y 3.0 mg L^{-1} .
2. Para el caso del contenido de los elementos estresantes en biomasa, se observó para todos los estresantes que la cantidad de que los niveles de Cr, Se y Na en biomasa aumentan conforme aumenta la concentración de estos elementos en el medio.
3. Para evaluar la captación se realizó el cálculo de BCF de cada estresante, los resultados muestran que para las condiciones de 0.5 mg L^{-1} de Na y Se se obtuvieron los valores máximos 1.05 y 1.0 respectivamente, para el caso de Cr fue el que reportó los menores valores de BCF en todas las concentraciones de este estresante, respecto a Se y Na.
4. La captación de algunos elementos esenciales se ve favorecida con la presencia de alguno de los estresantes. Únicamente para el caso de Ca se favoreció la captación con la presencia de los tres estresantes. La presencia de Cr parece favorecer la captación de Na y Mo comparado con el control. Para el caso de la biomasa obtenida de la exposición a NaCl se observa efecto de mejora en la captación de Mo y Fe respecto al control. Por último, para el caso de Se, hay un aumento en la captación de Ca, (tal como se reportó en estudios previos), para el caso de Zn, Fe y Cu hay un aumento de la captación de esto elementos en las condiciones de $0.5 - 3.0 \text{ mg L}^{-1}$.
5. Se implemento el procedimiento para la determinación de D-pinitol y myo-inositol por GC-MS/MS utilizando la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Una vez establecidas las condiciones de separación se evaluaron los principales parámetros analíticos. Los límites de detección instrumentales fueron de $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ y $2.8 \mu\text{g L}^{-1}$ para D-pinitol y Myo-inositol. La exactitud del método se evaluó mediante experimentos de recuperación obteniéndose porcentajes de recobro entre el $83 -116\%$.
6. Del análisis de los extractos Los valores encontrados en biomasa para D-pinitol van de 1.70 a $3.10 \mu\text{g mg}^{-1}$, mientras que para Myo-inositol el rango determinado fue de 0.51 a $1.0 \mu\text{g mg}^{-1}$. El comportamiento del contenido de ambos analitos para los estresantes (Cr, NaCl y Se) fue diferente. Para el caso de Cr conforme aumenta la concentración de Cr aumentó la cantidad de D-pinitol determinado respecto al tratamiento control, para el caso de myo-inositol con este mismo estresante el comportamiento no fue similar, sin embargo, la mayor concentración de este analito se determinó a la concentración de 10 mg Cr (VI)





L⁻¹. Para el NaCl todos los valores encontrados a las diferentes concentraciones fueron mayores que el tratamiento control, sin embargo el comportamiento fue diferente al reportado para Cr(VI), hay un aumento de la concentración de D-pinitol conforme aumenta la concentración de NaCl en medio de 0.5 a 3.0 mg L⁻¹, cabe mencionar que la mayor cantidad de este analito se encontró en la condición de 3.0 mg L⁻¹, a concentraciones superiores (5.0 y 10 mg L⁻¹) hay una disminución paulatina del analito; por otro lado, para myo-inositol conforme aumenta la concentración de NaCl en el medio aumenta la cantidad del compuesto en biomasa. Por último, para el caso de Se (IV), el comportamiento del contenido de D-pinitol y myo-inositol en las diferentes concentraciones del estresante fue similar entre ellos, se observa un aumento del contenido de ambos ciclitoles en la concentración más baja (0.5 mg L⁻¹) respecto al control, sin embargo, en la condición de 2.0 mg L⁻¹ hay una disminución del contenido de ambos compuestos respecto a las demás concentraciones de este estresante.

7. Una vez determinado el contenido de D-pinitol y myo-inositol, estos resultados fueron integrados con los obtenidos para la biomasa generada, el valor de BCF y el contenido elemental; todos datos fueron utilizados para realizar el análisis multivariante PCA. En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron las concentraciones de cada uno de los agentes estresantes que causaron efectos más favorables posible sobre parámetros evaluados en este trabajo; estos fueron: 3.5 mg L⁻¹ de Se en forma de Se (IV), 3.0 mg L⁻¹ de NaCl y 3.0 mg L⁻¹ de cromo en forma de Cr (VI). El hecho de que no solamente Se (IV), pero también estrés salino y presencia de Cr(VI) mejoraron la producción de biomasa y varios de los parámetros medidos en alfalfa, indican que las condiciones de estrés seleccionadas fueron suaves y la planta activó eficazmente sus mecanismos de defensa. De ahí se puede concluir que, la selección oportuna de los agentes de estrés abiótico y de las condiciones de exposición es una estrategia viable para la producción de forraje con composición mejorada.
8. En varios puntos del texto se enfatizó que los resultados obtenidos para Cr (VI) fueron inesperados y sorprendentes. Aunque la toxicidad de Cr (VI) para diferentes formas de vida es bien conocida, la exposición de alfalfa a concentraciones de hasta 5 mg L⁻¹ de cromo en esta forma tuvo efectos benéficos sobre el crecimiento y sobre varios parámetros evaluados en este trabajo. Se ha propuesto que los resultados obtenidos podrían deberse a la reducción del Cr (VI) en el medio de crecimiento, pero para confirmar esta hipótesis se requiere un estudio enfocado específicamente en los efectos del cromo.
9. En el caso de Se (IV), se confirmó la capacidad de alfalfa para la captación/acumulación de este importante elemento benéfico para las plantas y sus consumidores. Por otro lado sin embargo, los efectos de Se (IV) sobre el crecimiento, sobre el tráfico de micronutrientes minerales y sobre síntesis de ciclitoles no fueron más importantes que aquellos observados para otros agentes estresantes (considerando para cada uno de ellos la más favorable concentración en el medio, Tabla 24).

Como prospectiva para un trabajo futuro, es necesario enfocarse en el impacto de Cr (VI) en la planta de alfalfa. También se tiene como prospectiva un estudio de metabolómica no-dirigida, con el fin de encontrar metabolitos más específicamente relacionados con la identidad del agente estresante.





Referencias

1. Villegas-Becerril, A. Brotes y germinados. *Preelaboración y conservación de vegetales y setas. Maquinaria, equipos básicos, materias primas y regeneración de alimentos* 88–92 (2014).
2. Matilla, Á. J. Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* 537–558 (2003).
3. Courtis, A. C. Cátedra de Fisiología Vegetal Carreras : Profesorado y Licenciatura en. 1–22 (2013).
4. Matilla, Á. J. Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* 537–558 (2003).
5. Ayala Soto, R. E. Extracto de Càscara de Granada como Antimicrobiano y Potenciador Antioxidante en Germinado de Alfalfa. (2014).
6. Gujjaiah, S. & Kumari, C. EVALUATION OF CHANGES IN α -AMYLASE, β -AMYLASE AND PROTEASE DURING.pdf. **3**, 55–62 (2013).
7. Benefits, H. Sprouted Grains. *Sprouted Grains* (2019) doi:10.1016/c2016-0-01536-x.
8. Mira, B. Deshidratados y Germinados. *Indesol* 17–20 (2014).
9. Benefits, H. Sprouted Grains. *Sprouted Grains* (2019) doi:10.1016/c2016-0-01536-x.
10. Mira, B. Deshidratados y Germinados Indesol. *Indesol* 17–20 (2014).
11. Yamakoshi, Y. Proteinases. *European Journal of Oral Sciences* **119**, 241–244 (2011).
12. Nutrifacts. betacaroteno. 1–4.
13. Villegas-Becerril, A. Brotes y germinados. *Preelaboración y conservación de vegetales y setas. Maquinaria, equipos básicos, materias primas y regeneración de alimentos* 88–92 (2014).
14. NIH. Datos sobre la vitamina K. *National Institutes of Health* **7**, 1–3 (2019).
15. Troxler, S. ¿Por qué la Clorofila es saludable? *North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services Pimiento verde* **1070**, 1–2 (2014).
16. Murillo, S. Guías Nutricionales para la Población de Costa Rica - Micronutrientes: Calcio. (2010).
17. National Institutes of Health. Datos sobre el potasio. *Office of Dietary Supplements* **4** (2018).
18. National Institute of Health. Datos sobre el hierro. *Nih* 1–3 (2019).
19. Martíáñez Rodríguez, J. & Herrero Huerta, E. Oligoelementos y percepción sensorial. *Nutrición Hospitalaria* **4**, 2–13 (2011).
20. Kim, W. Y. *et al.* Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. (2016) doi:10.3389/fpls.2016.00187.





21. Courtis, A. C. Cátedra de Fisiología Vegetal Carreras : Profesorado y Licenciatura en. 1–22 (2013).
22. Calabrese, E. J. & Blain, R. B. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution* **157**, 42–48 (2009).
23. Nouri, M., El Rasafi, T. & Haddioui, A. *Lepidium sativum* L. HORMESIS INDUCED BY HEAVY METAL STRESS FOR SEED GERMINATION AND SEEDLING GROWTH. *Journal of Applied Science and Environmental Studies JASES* vol. 3 (2020).
24. Rahman, A. & Asaduzzaman, M. Statistical Modelling of Seed Germination and Seedlings Root Response of Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) to Different Stress. *Agricultural Research* **8**, 262–269 (2019).
25. Saha, U. Selenium in the Soil-Plant Environment: A Review. *International Journal of Applied Agricultural Sciences* **3**, 1 (2017).
26. Acta Physiologiae Plantarum.
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=16641&tip=sid>.
27. Wrobel, K., Guerrero Esperanza, M., Yanez Barrientos, E., Corrales Escobosa, A. R. & Wrobel, K. Different approaches in metabolomic analysis of plants exposed to selenium: a comprehensive review. *Acta Physiologiae Plantarum* vol. 42 1–20 (2020).
28. Elguera, J. C. T., Barrientos, E. Y., Wrobel, K. & Wrobel, K. Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 431–441 (2013).
29. Moreno, O. D. G., Aguilar, F. J. A. & Barrientos, E. Y. Selenium uptake and biotransformation and effect of selenium exposure on the essential and trace elements status: Comparative evaluation of four edible plants. *J Mex Chem Soc* **62**, 247–258 (2018).
30. Impact of Cadmium and Selenium Exposure on Trace Elements, Fatty Acids and Oxidative stress in *Lepidium sativum*.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2012000100002.
31. D'Amato, R. *et al.* Current Knowledge on Selenium Biofortification to Improve the Nutraceutical Profile of Food: A Comprehensive Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 68 4075–4097 (2020).
32. GUEVARA MORENO OSCAR DAVID. ESTUDIO ANALÍTICO DE LOS EFECTOS DE SELENIO COMO ESTRATEGIA DE BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE DIFERENTES ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES”.
33. Moreno., O. D. G., Wrobel., K., Escobosa., A. R. C. & Barrientos., E. Y. Estudio Analítico de los efectos de selenio como estrategia de biofortificacion de los germinados de diferentes especies vegetales comestibles. **18**, 0–1 (2018).
34. OSCAR DAVID GUEVARA MORENO. ESTUDIO ANALÍTICO DE LOS EFECTOS DE SELENIO COMO ESTRATEGIA DE BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE DIFERENTES ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES. (2019).





35. Moreno., O. D. G., Wrobel., K., Escobosa., A. R. C. & Barrientos., E. Y. Estudio Analítico de los efectos de selenio como estrategia de biofortificación de los germinados de diferentes especies vegetales comestibles. **18**, 0–1 (2018).
36. López-Sánchez, J. I., Moreno, D. A. & García-Viguera, C. D-pinitol, a highly valuable product from carob pods: Health-promoting effects and metabolic pathways of this natural super-food ingredient and its derivatives. *AIMS Agriculture and Food* vol. 3 41–63 (2018).
37. Asimakopoulos, G. *et al.* Effect of dietary myo-inositol supplementation on the insulin resistance and the prevention of gestational diabetes mellitus: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **21**, (2020).
38. Muscogiuri, G., Palomba, S., Laganà, A. S. & Orio, F. Inositols in the Treatment of Insulin-Mediated Diseases. *International Journal of Endocrinology* vol. 2016 (2016).
39. Owczarczyk-Saczonek, A. *et al.* The healing-promoting properties of selected cyclitols—A review. *Nutrients* vol. 10 (2018).
40. Unfer, V. *et al.* Hyperinsulinemia alters myoinositol to d-chiroinositol ratio in the follicular fluid of patients with PCOS. *Reproductive Sciences* **21**, (2014).
41. Ramp, P. *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of scyllo-inositol, a drug candidate against Alzheimer's disease. *Metabolic Engineering* **67**, (2021).
42. Monnard, I. *et al.* Plasma and urinary inositol isomer profiles measured by UHPLC-MS/MS reveal differences in scyllo-inositol levels between non-pregnant and pregnant women. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **412**, (2020).
43. Moreira, L. N. *et al.* The Cyclitol L-(+)-Bornesitol as an Active Marker for the Cardiovascular Activity of the Brazilian Medicinal Plant *Hancornia speciosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **42**, (2019).
44. Alves e Silva, M. *et al.* Effect of the Extract and Constituents From *Hancornia speciosa* Fruits in Osteoclasts. *Planta Medica International Open* **6**, (2019).
45. Wrobel, K., Yanez Barrientos, E., Wrobel, K., Lopez Torres, A. & Gutiérrez Corona, F. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: Effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 2397–2404 (2013).
46. Wu, Z. C. *et al.* Biosynthesis of quebrachitol, a transportable photosynthate, in *Litchi chinensis*. *Journal of Experimental Botany* **69**, 1649–1661 (2018).
47. Dumschott, K., Dechorgnat, J. & Merchant, A. Water deficit elicits a transcriptional response of genes governing d-pinitol biosynthesis in soybean (*Glycine max*). *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1–11 (2019).
48. Christou, C., Poulli, E., Yiannopoulos, S. & Agapiou, A. GC–MS analysis of D-pinitol in carob: Syrup and fruit (flesh and seed). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1116**, 60–64 (2019).





49. Sharma, N., Verma, M. K., Gupta, D. K., Satti, N. K. & Khajuria, R. K. Isolation and quantification of pinitol in *Argyrobolium roseum* plant, by ¹H-NMR. *Journal of Saudi Chemical Society* **20**, 81–87 (2016).
50. View of DETERMINATION OF CARBOHYDRATES CONTENT IN GENTIANA CRUCIATA L. BY GC_MS METHOD.pdf.
51. Ribeiro, E. D. S. *et al.* Free cyclitol, soluble carbohydrate and protein contents in *vigna unguiculata* and *phaseolus vulgaris* bean sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 4273–4278 (2011).
52. Masuda, R., Kaneko, K. & Yamashita, I. Sugar and cyclitol determination in vegetables by HPLC using postcolumn fluorescent derivatization. *Journal of Food Science* **61**, 1186–1190 (1996).
53. Rodríguez-Sánchez, S. *et al.* Analysis of cyclitols in different *Quercus* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 1735–1738 (2010).
54. Alañón, M. E., Ruiz-Matute, A. I., Martínez-Castro, I., Díaz-Maroto, M. C. & Pérez-Coello, M. S. Optimisation of pressurised liquid extraction for the determination of monosaccharides and polyalcohols in woods used in wine aging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 2558–2564 (2009).
55. Yusupova, U. Y. *et al.* Biological Active Components of *Silene Tomentella* and Their Pharmacological Properties. *Chemistry of Plant Raw Material* 197–202 (2021) doi:10.14258/jcprm.2021018323.
56. Liu, X., Villalta, P. W. & Sturla, S. J. Simultaneous determination of inositol and inositol phosphates in complex biological matrices: Quantitative ion-exchange chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 705–712 (2009).
57. Alfalfa Cyclitols. **23**, 1786–1787 (1984).
58. Ruiz-Aceituno, L., García-Sarrió, M. J., Alonso-Rodríguez, B., Ramos, L. & Sanz, M. L. Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry* **196**, 1156–1162 (2016).
59. Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES) Application eHandbook.
60. DETERMINATION OF GASEOUS ORGANIC COMPOUNDS BY DIRECT INTERFACE GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY INTRODUCTION. (1997).
61. CROMATOGRAFIA DE GASES.
62. Nthai, D., Thibane, S. & Gololo, S. S. Comparative Study of Abiotic Stress Factors on GC-MS-Detected Phytoconstituents of *Aloe greatheadii* var: *davyana* Using Heat Map and Hierarchical Clustering Dendrogram. (2022) doi:10.1155/2022/5365024.





63. Verslues, P. E. Rapid Quantification of Abscisic Acid by GC-MS/MS for Studies of Abiotic Stress Response. *Methods in Molecular Biology* **1631**,.
64. Zhao, X. *et al.* Molecular Sciences GC-MS-Based Nontargeted and Targeted Metabolic Profiling Identifies Changes in the Lentinula edodes Mycelial Metabolome under High-Temperature Stress. *Int. J. Mol. Sci* **20**, 2330 (2019).
65. Lavergne, F. D. *et al.* GC-MS Metabolomics to Evaluate the Composition of Plant Cuticular Waxes for Four Triticum aestivum Cultivars. doi:10.3390/ijms19020249.
66. Lu, X. *et al.* Comparative metabolomics of two saline-alkali tolerant plants Suaeda glauca and Puccinellia tenuiflora based on GC-MS platform. *Natural Product Research* **35**, (2021).
67. Wrobel, K., Gómez Ojeda, A., Corrales Escobosa, A. R., Wrobel, K. & Yanez Barrientos, E. Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in Lepidium sativum. *Metallomics* **5**, 1254–1261 (2013).
68. Wakeel, A. & Xu, M. Chromium Morpho-Phytotoxicity. doi:10.3390/plants9050564.
69. Yamazaki, K. *et al.* Effect of salt tolerance on biomass production in a large population of sorghum accessions. doi:10.1270/jsbbs.19009.
70. Rezaeian, M., Tohidi Moghadam, M., Kiaei, M. M. & Mahmud Zadeh, H. The effect of heavy metals on the nutritional value of Alfalfa: comparison of nutrients and heavy metals of Alfalfa (Medicago sativa) in industrial and non-industrial areas. *Toxicological Research* **36**, 183–193 (2020).

