



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

**FCEN**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES  
Naturaleza - Ciencia - Humanismo



**PROBIOL**  
PROGRAMA DE POSGRADO  
EN BIOLOGÍA

## **Tesis Doctoral**

# **BIOFORTIFICACIÓN DE CLONES DE AJO ARGENTINO CON SELENIO: EVALUACIÓN AGRONÓMICA Y METALÓMICA**

**Tesista: Ing. María Belén Perez**

**Director: Dr. Rodolfo G. Wuilloud**

**Co-director: Dra. María Flavia Filippini**

**Laboratorio de Química Analítica para Investigación y Desarrollo  
(QUIANID)**

**Instituto Interdisciplinario de Ciencias Básicas (ICB) – FCEN –  
UNCUYO – CONICET**

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, lo más valioso que poseo, por su apoyo incondicional, esfuerzo y comprensión a lo largo de todos estos años.

A Dios por brindarme la fuerza para seguir adelante ante los momentos adversos e iluminar mi camino.

Al Dr. Rodolfo G. Wuilloud y a la Dra. María Flavia Filippini por darme el espacio para llevar a cabo esta tesis, por sus aportes y sugerencias que guiaron este aprendizaje.

Al Ing. Agr. (MSc.) Víctor Mario Lipinski quien sin su apoyo y contribuciones esta tesis no podría haberse llevado a cabo.

A mis amigos y compañeros del QUIANID, por el apoyo, consejos y por todos los momentos inolvidables que hemos vivido.

Al CONICET, a la UNCUYO y al INTA por darme los recursos y el espacio para llevar a cabo mis investigaciones.

Y por último a todos los integrantes del PROBIOL por su acompañamiento durante estos años.

¡Simplemente, muchas gracias a todos!

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es un alimento funcional capaz de acumular elevadas cantidades de Selenio (Se), un elemento traza esencial, que protege contra enfermedades cardiovasculares, estimula el sistema inmunológico y es antioxidante. Este es metabolizado mayoritariamente formando compuestos orgánicos con propiedades que promueven un efecto anticancerígeno, aunque también pueden observarse formas químicas de diversa naturaleza. Por lo que la caracterización detallada de su identidad es crucial para evaluar los verdaderos beneficios de la incorporación de Se en las plantas ajo.

Las investigaciones referidas a la acumulación, metabolización y transformación del Se en ajos son necesarias para evaluar correctamente la relación riesgo/beneficio derivada de la presencia de especies de Se en dicho alimento funcional, requiriendo el desarrollo de métodos analíticos modernos que incorporan técnicas instrumentales híbridas para una adecuada caracterización cuali- y cuantitativa.

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral ha sido evaluar la biofortificación de ajo con Se y determinar su metabolización, de manera de contribuir al posicionamiento de dicha hortaliza como un alimento de alto valor nutricional y con propiedades funcionales y beneficiosas para la salud.

Durante el desarrollo de esta tesis se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: a campo y en maceta. En el ensayo a campo, se estudiaron 4 variedades clonales (Rubí INTA, Gostoso INTA, Nieve INTA y Unión FCA) y 3 dosis: 0, 600 y 1200 g (Se) ha<sup>-1</sup>, con un diseño de parcelas al azar y 3 repeticiones. En los ensayos en macetas, los clones Rubí INTA y Nieve INTA fueron estudiados evaluando cuatro dosis: 0, 5, 10 y 15 kg (Se) ha<sup>-1</sup>, con un diseño de parcelas al azar, 3 repeticiones y 3 muestreos. Además, se realizó

un estudio diferencial de las 4 variedades clonales, en macetas, aplicando 0, 15, 30 y 45 kg (Se) ha<sup>-1</sup> bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente. Las muestras de cada ensayo fueron peladas, picadas, liofilizadas y almacenadas hasta el momento del análisis. El Se total se determinó por espectrometría de fluorescencia atómica (AFS). Fe, Cu, Mn, Mg, S y P fueron determinados por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El peso molecular de las Se-proteínas se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con detección ICP-MS. Finalmente la cromatografía de intercambio aniónico (AEC) se acopló a ICP-MS y a AFS para evaluar los Se-aminoácidos. La caracterización de los Se-aminoácidos se realizó por espectrometría de masas de alta resolución acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-ESI-MS/MS).

Los resultados de las investigaciones realizadas no evidenciaron diferencias significativas en el rendimiento de bulbos entre los tratamientos aplicados cuando las dosis de Se son bajas, pero sí se observó una acumulación de Se diferencial y significativa entre clones tratados con Se y el testigo. Las variedades coloradas mostraron ser más eficientes acumulando mayores cantidades de Se que las variedades blancas ensayadas cuando este es incorporado al sustrato. El Se presentó un comportamiento similar a la de otros elementos durante en desarrollo de la planta. Su concentración disminuyó en hojas y raíces mientras que en bulbos aumentó a medida que la planta se desarrolló. Además, se observó que la presencia de Se modifica significativamente la acumulación y distribución de elementos como Mg, P, Zn, Mn, Fe, Cu y S en las plantas de ajo. Los cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) mostraron la incorporación de Se a fracciones de alto (37-5 kDa) y bajo peso molecular (2-4 kDa). El Se presente en la fracción de bajo peso molecular aumentó en los bulbos, mientras que en las hojas disminuyó en la última etapa del desarrollo, mientras que, en raíces, ambas fracciones se

redujeron. Los cromatogramas de intercambio aniónico (AEC) mostraron mayoritariamente la presencia de Se-metilselenocisteína (SeMeSeCys). La concentración de este Se aminoácido aumentó en los bulbos a medida que estos se desarrollaron, a diferencia de lo observado en hojas donde se observó una disminución.

Como conclusión de las investigaciones involucradas en el presente plan de tesis doctoral, puede mencionarse que Se no afecta significativamente el desarrollo de las plantas de ajo cuando las dosis son bajas. La planta de ajo es capaz de acumular grandes cantidades de Se y metabolizarlo mayoritariamente en SeMeSeCys, un importante aminoácido con propiedades anticancerígenas. La aplicación de Se al sustrato de crecimiento es más conveniente que la aplicación foliar, dado que el Se es metabolizado mayoritariamente en Se orgánico. Las variedades coloradas son más eficientes para acumular y metabolizar Se que las variedades blancas cuando el elemento es incorporado al sustrato. Por lo que, el ajo tiene una gran capacidad de acumular y metabolizar Se y es una buena opción para suplementar Se en la dieta humana.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a functional food that can accumulate high amounts of Selenium (Se), an essential trace element, which protects against cardiovascular diseases, stimulates the immune system and is antioxidant. This is metabolized mainly in organic compounds with anticancer effect, although chemical forms of different nature can also be observed. So, the detailed characterization of their identity is crucial to assess the true benefits of incorporating Se into garlic plants.

The investigations related to the accumulation, metabolization and transformation of Se in garlic are necessary to evaluate the risk / benefit relationship derived from the presence of Se species in this functional food, requiring the development of modern analytical methods that incorporate hybrid instrumental techniques for an adequate qualitative and quantitative characterization.

The general objective of this doctoral thesis has been to evaluate the biofortification of garlic with Se and determine its metabolization, to contribute to the positioning of this vegetable as a food of high nutritional value and with functional and beneficial properties for health.

During the development of this thesis, two types of experiment were carried out. In the field experiment 4 clonal varieties were studied (Rubí INTA, Gostoso INTA, Nieve INTA and Unión FCA) and 3 doses: 0, 600 and 1200 g (Se) ha<sup>-1</sup>, with a design of random plots and 3 repetitions. In the pot experiment, the Rubí INTA and Nieve INTA clones were studied evaluating four doses: 0, 5, 10 and 15 kg (Se) ha<sup>-1</sup>, with a random plot design, 3 replications and 3 samplings. In addition, a differential study of the 4 clonal varieties was carried out in pots, applying 0, 15, 30 and 45 kg (Se) ha<sup>-1</sup> under the same conditions indicated above. The samples of each test were peeled, chopped, lyophilized

and stored until the moment of the analysis. The total Se was determined by atomic fluorescence spectrometry (AFS). Fe, Cu, Mn, Mg, S and P were determined by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS). The molecular weight of the Se-proteins was evaluated by size exclusion chromatography (SEC) with ICP-MS detection. Finally, anion exchange chromatography (AEC) was coupled to ICP-MS and AFS to evaluate Se-amino acids. The characterization of the Se-amino acids was carried out by high-resolution mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC-ESI-MS / MS).

The results of the investigations carried out showed no significant differences in the yield of bulbs when Se doses are low, but a differential and significant Se accumulation was observed between clones treated with Se and the control. The red varieties showed to be more efficient accumulating greater amounts of Se than the white varieties tested when Se is incorporated to the substrate. The behavior was similar to other elements during the development of the plant. Its concentration decreased in leaves and roots while in bulbs it increased as the plant developed. In addition, it was observed that the presence of Se significantly modifies the accumulation and distribution of elements such as Mg, P, Zn, Mn, Fe, Cu and S in garlic plants. Size exclusion chromatograms (SEC) showed the incorporation of Se into fractions of high (37-5 kDa) and low molecular weight (2-4 kDa). The fraction of low molecular weight increased in the bulbs, while in the leaves decreased in the last stage of development, while in roots, both fractions were reduced. The anion exchange chromatograms (AEC) mostly showed the presence of Se-methylselenocysteine (Se-MeSeCys). The concentration of this amino acid was increased in the bulbs as they developed, while in leaves, it was decreased.

As a conclusion of these investigation, it can be mentioned that Se does not significantly affect the development of garlic plants when doses are low. The garlic plant

can accumulate large amounts of Se and metabolize it mostly in Se-MeSeCys, an important amino acid with anticancer properties. The application of Se to the substrate is more convenient than the foliar application, since Se is metabolized mainly in organic Se. The red varieties are more efficient to accumulate and metabolize than the white varieties when the element is incorporated into the substrate. So, garlic has a great capacity to accumulate and metabolize Se and is a good option to supplement Se in the human diet.

# Índice

## **Capítulo 1: Introducción**

<b>1.1-Selenio</b>	1
1.1.1-Generalidades	1
1.1.2-Importancia de la especiación de Se	4
1.1.3-Acumulación de Se en plantas	7
1.1.4-Metabilización de Se en plantas	9
1.1.5-Efectos beneficiosos del Se para las plantas	12
1.1.6-Toxicidad del Se en las plantas	15
1.1.7-Biofortificación de plantas con Se	17
1.1.8-Bibliografía	21
<b>1.2-Ajo (<i>Allium sativum</i> L)</b>	35
1.2.1-Generalidades	35
1.2.2-Morfología y fisiología	37
1.2.3-Taxonomía del ajo	39
1.2.4-Ciclo de la planta de ajo	40
1.2.5- Grupos ecofisiológicos de ajo en la Argentina	44
1.2.6-Importancia del cultivo de ajo en Argentina	46
1.2.7-Selenio y el ajo	48
1.2.8- Otros fitoquímicos presentes en el ajo	50
1.2.9-Bibliografía	51
<b>1.3-Hipótesis general</b>	56
<b>1.4-Hipotesis específicas</b>	56
<b>1.5-Objetivo general</b>	56
<b>1.6-Objetivos específicos</b>	56

## **Capítulo 2: Materiales y métodos**

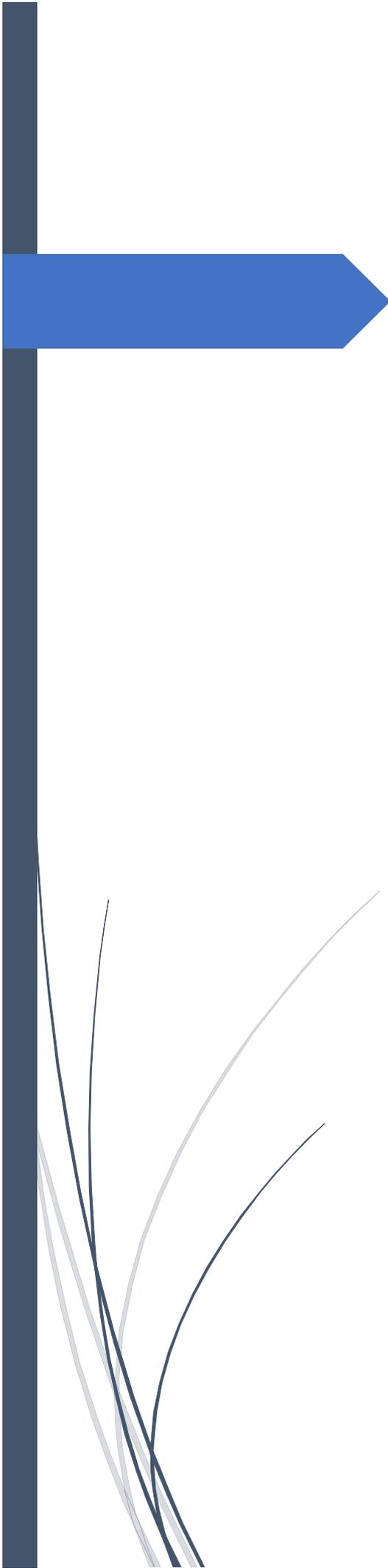
<b>2.1-Reactivos</b>	58
<b>2.2- Biofortificación de plantas de ajo con Se</b>	60
2.2.1-Ensayo a campo	60
2.2.2-Ensayos en macetas	61
2.2.2.1-Ensayos en macetas 2014	61
2.2.2.2-Ensayos en macetas 2015	62
2.2.2.3-Ensayos en macetas 2016	63
<b>2.3-Procesamiento de las muestras</b>	64
2.3.1-Procesamiento de las muestras luego del muestreo	64
2.3.2- Determinación del porcentaje de sólidos	64
2.3.3- Digestión	64
2.3.4-Extracción de proteínas	65
2.3.5-Extracción enzimática	65
<b>2.4-Métodos tradicionales de cocción</b>	66
2.4.1-Horno convencional	66
2.4.2-Cocción en agua en ebullición	66
2.4.3-Microondas	66
2.4.4-Cocción en vapor	66
2.4.5-Cocción en aceite a 180°C	67

<b>2.5- Determinaciones analíticas</b>	67
2.5.1-Determinación de Se total por HG-AFS	67
2.5.2-Determinación de Cu, Fe, Mg, Mn, P, S, Zn por ICP-MS	69
2.5.3- Análisis de especiación de Se por HPLC	71
2.5.3.1-Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	72
2.5.3.2-Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)	74
2.5.4-Identificación de especies de Se por LC-ESI-MS/MS	77
<b>2.6-Factor de translocación (FT)</b>	79
<b>2.7-Análisis estadístico</b>	79
<b>2.8-Bibliografía</b>	79

### **Capítulo 3: Resultados y discusión**

<b>3.1- Estudios de acumulación y especiación de Se en diferentes variedades clonales de ajo argentino cultivadas en condiciones de campo</b>	81
3.1.1-Efecto de la biofortificación de Se sobre el rendimiento de los bulbos	82
3.1.2-Acumulación de Se en diferentes variedades clonales	84
3.1.3-Evaluación de los perfiles proteicos asociados con Se	86
3.1.4-Determinación de las especies orgánicas e inorgánicas de Se presentes en las variedades clonales	90
3.1.5- Bibliografía	96
<b>3.2- Estudios de acumulación y distribución de Se en plantas de ajo durante su crecimiento</b>	100
3.2.1-Distribución de Se en diferentes órganos de las plantas de ajo durante su crecimiento	101
3.2.2-Acumulación de Se en diferentes órganos de plantas de ajos durante su crecimiento	104
3.2.3-Efecto del Se sobre el peso fresco de las plantas de ajo	110
3.2.4-Efecto del Se sobre la acumulación y distribución de otros macro- y micro-elementos	113
3.2.5-Bibliografía	117
<b>3.3-Estudios de especiación de Se en diferentes etapas del crecimiento de las plantas de ajo</b>	121
3.3.1-Determinación de los perfiles proteicos asociados con Se en diferentes etapas del desarrollo	122
3.3.2-Análisis de especiación de Se en las etapas del crecimiento de las plantas de ajo	127
3.3.3-Bibliografía	137
<b>3.4- Acumulación, distribución y especiación de Se en variedades clonales de ajo cultivadas en invernáculo</b>	141
3.4.1-Acumulación de Se en diferentes variedades clonales de ajo	142
3.4.2-Efecto del Se sobre el peso fresco obtenido de las diferentes variedades clonales de ajo	144
3.4.3-Análisis de especiación de Se en diferentes variedades clonales de ajo de invernáculo	147
3.4.4-Characterización de Se aminoácidos por LC-ESI-MS-MS	152
3.4.5-Bibliografía	158
<b>3.5- Efecto de métodos tradicionales de cocción sobre el contenido y especiación de Se en ajo</b>	162

3.5.1- Variación de la concentración de Se en ajo con los métodos de cocción	164
3.5.2- Influencia de la cocción en los perfiles proteicos asociados a Se	166
3.5.3- Modificaciones en la especiación de Se en ajo frente a los métodos de cocción	170
3.5.4-Bibliografía	176
<b>Capítulo 4: Conclusiones</b>	<b>179</b>



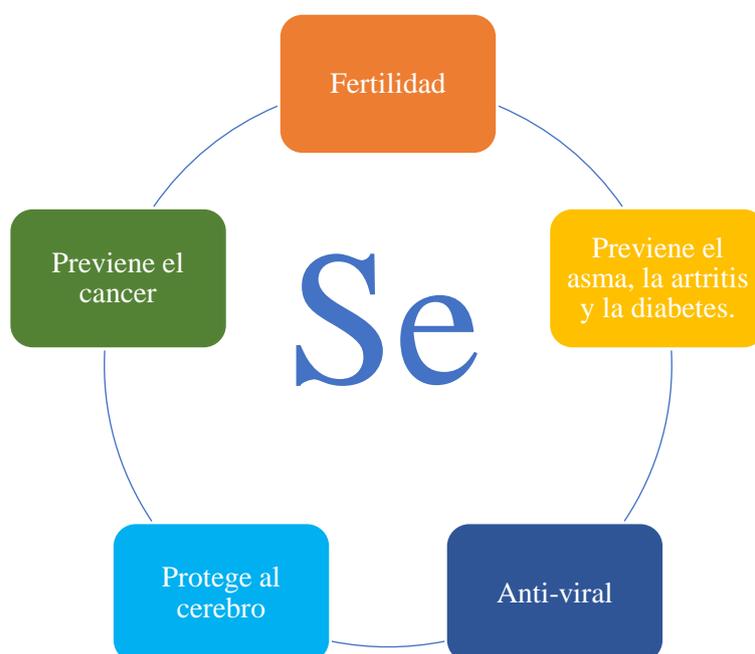
# Capítulo 1: Introducción

## 1.1-SELENIO

### 1.1.1-GENERALIDADES

El Selenio (Se) es un micronutriente que fue descubierto en 1817 por el químico y médico sueco Jons Jacob Berzelius (Berzelius, 1818). El origen de su nombre es griego y significa “luna”, de hecho, cuando se enfría rápidamente al derretirse, produce un brillo similar al de la Luna (Duntas and Benvenga, 2015). El Se pertenece al grupo VIA y es un metaloide con un peso atómico de 78,96 y rara vez ocurre en la naturaleza en su forma elemental pura (Garcia-Banuelos et al., 2011). Este elemento comparte muchas propiedades químicas similares con el azufre (S), aunque el átomo de Se es ligeramente más grande (Garcia-Banuelos et al., 2011). El Se puede existir bajo cinco estados de valencia: seleniuro (2-), Se elemental (0), tioselenato (2+), selenito (4+) y selenato (6+) (Garcia-Banuelos et al., 2011). El Se es muy móvil en condiciones de oxidación, pero su movilidad disminuye al disminuir el pH (Broadley et al., 2006). Su esencialidad en humanos y animales fue descubierta 140 años después de su descubrimiento (Schwarz and Foltz, 1957). Pero cabe destacar que el Se es esencial sólo en un determinado rango de concentraciones, porque a valores elevados este elemento es tóxico (Michalska-Kacymirow et al., 2014). Sin embargo, cabe destacar que en todo el mundo, los casos de deficiencia de Se son más comunes que los casos de toxicidad. La deficiencia de Se afecta la fertilidad, favorece la aparición de enfermedades cardiovasculares e infecciones (Duntas and Benvenga, 2015). Mientras que, la toxicidad por Se (selenosis) puede ser aguda o crónica generando diarrea, fatiga, pérdida de cabello, artralgia, decoloración o fragilidad de las uñas y náuseas (Aldosary et al., 2012; Duntas and Benvenga, 2015). Por lo que el consumo diario de Se debe ser de alrededor de 50 µg (Se) por día, pero esto varía de acuerdo con el país o la región, la edad y el sexo (Ghasemi et al., 2015).

El Se juega un papel importante en la reproducción, la función normal de la glándula tiroides, la inmunidad, previene enfermedades cardiovasculares, y se ha demostrado que presenta propiedades anticancerígenas (Duntas and Benvenga, 2015). Este elemento también funciona como el cofactor de la enzima glutatión peroxidasa que presenta importantes propiedades biológicas dado que protege al organismo del daño oxidativo (Slekovec and Goessler, 2005). En la Figura 1.1.1 se muestran los efectos benéficos de Se en los seres humanos.



**Figura 1.1.1: Efectos benéficos del Se en los seres humanos**

La manera de mantener niveles óptimos de Se en los seres humanos es a través de una dieta adecuada. Las fuentes de Se pueden ser alimentos de origen animal como la leche, los huevos, el pollo y el pescado que contienen entre 13,1 a 368 ng Se g<sup>-1</sup>, y de origen vegetal como los cereales, las legumbres y las nueces que contienen entre 24,4 a 443,9 ng Se g<sup>-1</sup> (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique, 2008). Pero hay que considerar

que el contenido de Se en los alimentos varía geográficamente entre países e inclusive dentro del mismo país (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique, 2008).

Otra opción atractiva para suplementar Se en la dieta humana son los cultivos enriquecidos con Se donde se destacan las plantas del género *Brassica*, como el brócoli, y del género *Allium*, como el ajo, debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de Se (hasta 1000 ppm), sin sufrir efectos tóxicos y sin ser este un elemento esencial para ellas (Dumont et al., 2006). En lugares con bajo contenido de Se en los suelos, la manera de enriquecer los cultivos con Se es utilizando fertilizantes enriquecidos con Se o rociando los cultivos con sales de Se, entre otras opciones (Slekovec and Goessler, 2005). Las plantas toman el Se mayoritariamente bajo la forma de selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) y lo metabolizan en diferentes Se-aminoácidos como Selenometionina (SeMet), Selenocisteína (SeCys),  $\gamma$ -glutamil-Se-metilselenocisteína ( $\gamma$ -Glu-Se-MeSecys) y Se-metil-Se-cisteína (Se-MeSeCys) (Terry et al., 2000). Estas formas orgánicas de Se presentan mayor biodisponibilidad para el ser humano que las formas inorgánicas, además,  $\gamma$ -glutamil-Se-metilselenocisteína y Se-metil-Se-cisteína son conocidos por ser precursores del metilselenol, un importante agente anticancerígeno en animales y humanos (Thiry et al., 2013).

Otro aspecto que considerar es la forma en que los alimentos son consumidos dado que el contenido de Se en los alimentos se pierde en gran medida mediante el procesamiento y la cocción (Finley, 2006). Por ejemplo, pérdidas de Se entorno al 40% se observaron en espárragos y champiñones cuando se hervían por algunos minutos. También se observaron pérdidas en el contenido de Se en pollo y pescado asados (Navarro-Alarcon and López-Martinez, 2000; Thomson and Robinson, 1990). Estas pérdidas se debieron en mayor medida a la volatilización del Se. Sin embargo, otras investigaciones no encontraron ninguna disminución en el contenido de Se e incluso se

informó que procesos tales como la cocción o liofilización pueden aumentar significativamente el contenido de Se en algunos alimentos (Zhang et al., 1993).

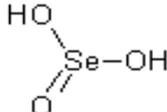
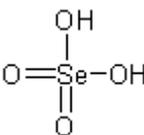
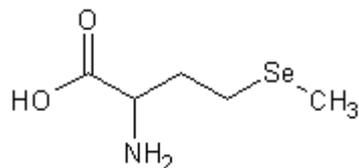
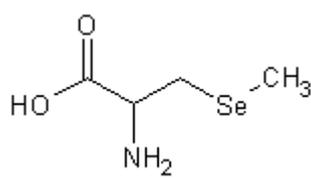
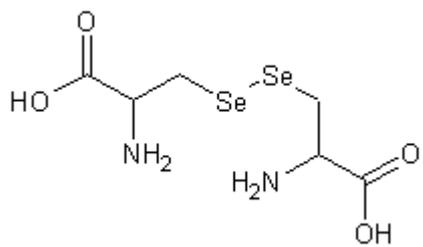
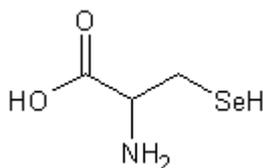
Por lo que la actividad biológica del Se depende de su disposición metabólica, especies químicas, concentración en los alimentos y la forma en que el alimento es consumido.

### 1.1.2- IMPORTANCIA DE LA ESPECIACIÓN DE Se

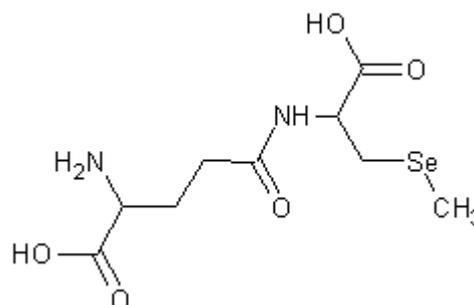
El análisis de especiación se entiende como la identificación y determinación cuantitativa de las diferentes formas químicas en que elementos químicos como Se están presentes en una muestra (Templeton et al., 2000). Las formas químicas o especies de Se que existen son realmente diversas y esto implica entonces que el elemento posee una especiación realmente compleja. De esta manera, las especies de Se de mayor relevancia ambiental, biológica y nutricional, incluyen a especies inorgánicas tales como selenito (Se(IV)) y selenato (Se(VI)), y especies orgánicas simples como metilselenol, dimetilselenuro, dietilselenuro y dimetiloselenoóxido, aminoácidos y especies de bajo peso molecular como selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys), selenocistina (SeCys<sub>2</sub>), selenohomocisteína (SeHoCys<sub>2</sub>), Se-metilselenocisteína (Se-MeSeCys), Se-metilselenometionina (Se-MeSeMet), Se- alilselenocisteína (SeAllSeCys), Se-propilselenocisteína (SePrSeCys),  $\gamma$ glutamyl-Se-metilselenocisteína ( $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys), Se-adenosilselenohomocisteína, selenoglutatión y otros compuestos como selenoproteínas o selenoenzimas (Kieliszek and Błażej, 2013; Whanger, 2002). Un resumen de especies de Se relevantes en sistemas biológicos se muestra en la Tabla 1.1.1. Del análisis de la misma, es posible afirmar entonces, que debido a la gran diversidad de especies de Se que existen, con toda su variedad de efectos posibles, biodisponibilidad, propiedades químicas y físicas, etc., el análisis de especiación de Se es una actividad analítica fundamental a la hora de evaluar la presencia de este elemento en muestras de

alimentos, biológicas o ambientales, surgiendo la necesidad de contar con datos analíticos confiables y validados, así como con métodos analíticos adecuados que aseguren la correcta identificación y cuantificación de las diferentes especies.

**Tabla 1.1.1:** Especies de Se relevantes en sistemas biológicos.

Especie	Fórmula	Estructura
Selenito [Se(IV)]	$H_2SeO_3$	
Selenato [Se(VI)]	$H_2SeO_4$	
Selenometionina (SeMet)	$C_5H_{11}NO_2Se$	
Selenometil Selenocisteína (Se- MeSeCys)	$C_4H_9NO_2Se$	
Selenocistina (SeCysCysSe)	$C_6H_{12}N_2O_4Se_2$	
Selenocisteína (SeCys)	$C_3H_7NO_2Se$	

$\gamma$ -glutamil  
selenometilselenocisteína  
( $\gamma$ -Glu-Se-MeSecys)



En la actualidad, los métodos analíticos más utilizados para el análisis de especiación de Se involucra el acoplamiento de técnicas instrumentales de separación cromatográfica o electroforética a técnicas de detección elemental específica, tales como la espectrometría de masas atómicas por fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Wu and Sun, 2016). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que opera bajo diferentes modos (exclusión por tamaño, intercambio iónico y fase reversa), brinda la posibilidad de separar especies no volátiles de Se sin la necesidad de una derivatización de las especies de Se previo al análisis de especiación (Wu and Sun, 2016). En todas las técnicas instrumentales acopladas o híbridas que involucran a las técnicas espectrométricas atómicas como ICP-MS, espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) o espectrometría de absorción atómica (AAS), la identificación de las especies separadas se basa principalmente en la comparación de los tiempos de retención con los de los patrones químicos y/o por el método del agregado patrón (Heftmann, 2004). Sin embargo, muchas veces los patrones no están disponibles comercialmente para todas especies de Se. Este inconveniente se ha resuelto mediante la síntesis de aquellas especies que se esperan encontrar en las muestras analizadas o mediante el aislamiento y purificación de las especies presentes en las muestras, seguido de una posterior identificación por espectrometría de masas molecular (Połatajko et al., 2006).

### 1.1.3-ACUMULACIÓN DE Se EN PLANTAS

El  $\text{SeO}_4^{-2}$  es la forma de Se que predomina en suelos alcalinos y oxidados mientras que  $\text{SeO}_3^{-2}$  predomina en aquellos suelos minerales bien drenados donde el pH varía de ácido a neutro (Elrashidi et al., 1987). Sin embargo, las plantas toman del suelo preferentemente al  $\text{SeO}_4^{-2}$  dado que es químicamente semejante a sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ), el cual es esencial para la planta (Sors et al., 2005). Otra razón por la cual  $\text{SeO}_3^{-2}$  está menos biodisponible para las plantas que  $\text{SeO}_4^{-2}$  es que esta especie es fuertemente absorbida sobre la superficie de óxidos de hierro y/o hidróxidos presentes naturalmente en el suelo (Barrow and Whelan, 1989).

Las especies  $\text{SeO}_4^{-2}$  y  $\text{SO}_4^{-2}$  compiten por los mismos transportadores en la planta pero estos últimos presentan una alta selectividad hacia el  $\text{SO}_4^{-2}$  con respecto al  $\text{SeO}_4^{-2}$  por lo que a altas concentraciones de  $\text{SO}_4^{-2}$  la acumulación de Se se ve altamente perjudicada (White et al., 2004). Sin embargo, las plantas podrían poseer transportadores de azufre con diferente selectividad hacia el  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{SeO}_4^{-2}$  (Barberon et al., 2008). De hecho, se ha observado que los transportadores SULTR1,1 y SULTR1;2 podrían ser los responsables de la alta afinidad que tienen las plantas por incorporar el  $\text{SO}_4^{-2}$  del suelo (Barberon et al., 2008). Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* demostraron que esta carece del transportador SULTR1;2, pero no del SULTR1,1 (Barberon et al., 2008)). Estas plantas mostraron una alta resistencia al  $\text{SeO}_4^{-2}$  (Barberon et al., 2008). Por lo que SULTR1;2 es el transportador responsable de tomar el  $\text{SeO}_4^{-2}$  desde el suelo hacia las raíces (Barberon et al., 2008). Aunque, se desconoce si SULTR1;2 podría presentar una mayor selectividad hacia  $\text{SeO}_4^{-2}$  por lo que, un mejor entendimiento de la selectividad de estos transportadores a nivel molecular podría aumentar la eficiencia de la biofortificación de plantas con Se (Zhu et al., 2009).

El  $\text{SeO}_4^{-2}$  es rápidamente transportado desde las raíces a las hojas donde seguirá la misma ruta metabólica que el  $\text{SO}_4^{-2}$  (Li et al., 2008). Por el contrario,  $\text{SeO}_3^{-2}$  permanece mayormente en las raíces donde es rápidamente metabolizado, y sólo un pequeño porcentaje será transportado hacia las hojas (Li et al., 2008). El transporte de  $\text{SeO}_3^{-2}$  es un proceso pasivo que es inhibido por la presencia de fosfato (Hopper and Parker, 1999).

Las plantas podrían ser suplementadas con diferentes especies de Se, ya sean inorgánicas, como  $\text{SeO}_4^{-2}$  y  $\text{SeO}_3^{-2}$ , u orgánicas, como la Se-Met. Asimismo, la velocidad de translocación depende de la concentración y de las especies de Se presentes. De esta manera se observó que la relación entre la concentración de Se de los brotes con respecto a la concentración de Se en la raíz va de 1,4 a 17,2 cuando se emplea  $\text{SeO}_4^{-2}$ , de 0,6 a 1 cuando se emplea SeMet y es de menos de 0,5 cuando las plantas son suplidas con  $\text{SeO}_3^{-2}$  (Zayed et al., 1998). Por lo que  $\text{SeO}_4^{-2}$  es la forma más recomendada para suplementar a las plantas con Se.

Las plantas difieren en su habilidad para acumular Se. La mayoría de las plantas contienen bajas concentraciones de Se, menos de  $5 \text{ mg Se g}^{-1}$  de peso seco, y rara vez superan los  $50 \text{ mg Se g}^{-1}$  peso seco incluso cuando se cultivan en suelos con alto contenido de Se. Estas plantas son denominadas no acumuladores (Mayland et al., 1989; Parker et al., 1992). Sin embargo, existe un número limitado de plantas especializadas, que a menudo crecen en suelos naturalmente ricos en Se y que pueden acumular grandes cantidades de Se. Estas son denominadas acumuladoras (Mayland et al., 1989). Las plantas acumuladoras se pueden dividir en dos grupos: acumuladores primarios (hiperacumuladores) y acumuladores secundarios (especie indicadora). Las plantas hiperacumuladoras pueden presentar concentraciones de Se en el rango de los miles de  $\text{mg Se kg}^{-1}$  (Mayland et al., 1989). Dentro de este grupo se encuentran las especies del género *Allium* como el ajo (Ghasemi et al., 2015). De este modo, las plantas que son

acumuladoras secundarias presentan concentraciones de Se en el rango de los cientos de mg Se kg<sup>-1</sup> (Parker et al., 1992). Dentro de este grupo se encuentran especies del género *Brassica* como la mostaza de la India (Banuelos et al., 1990).

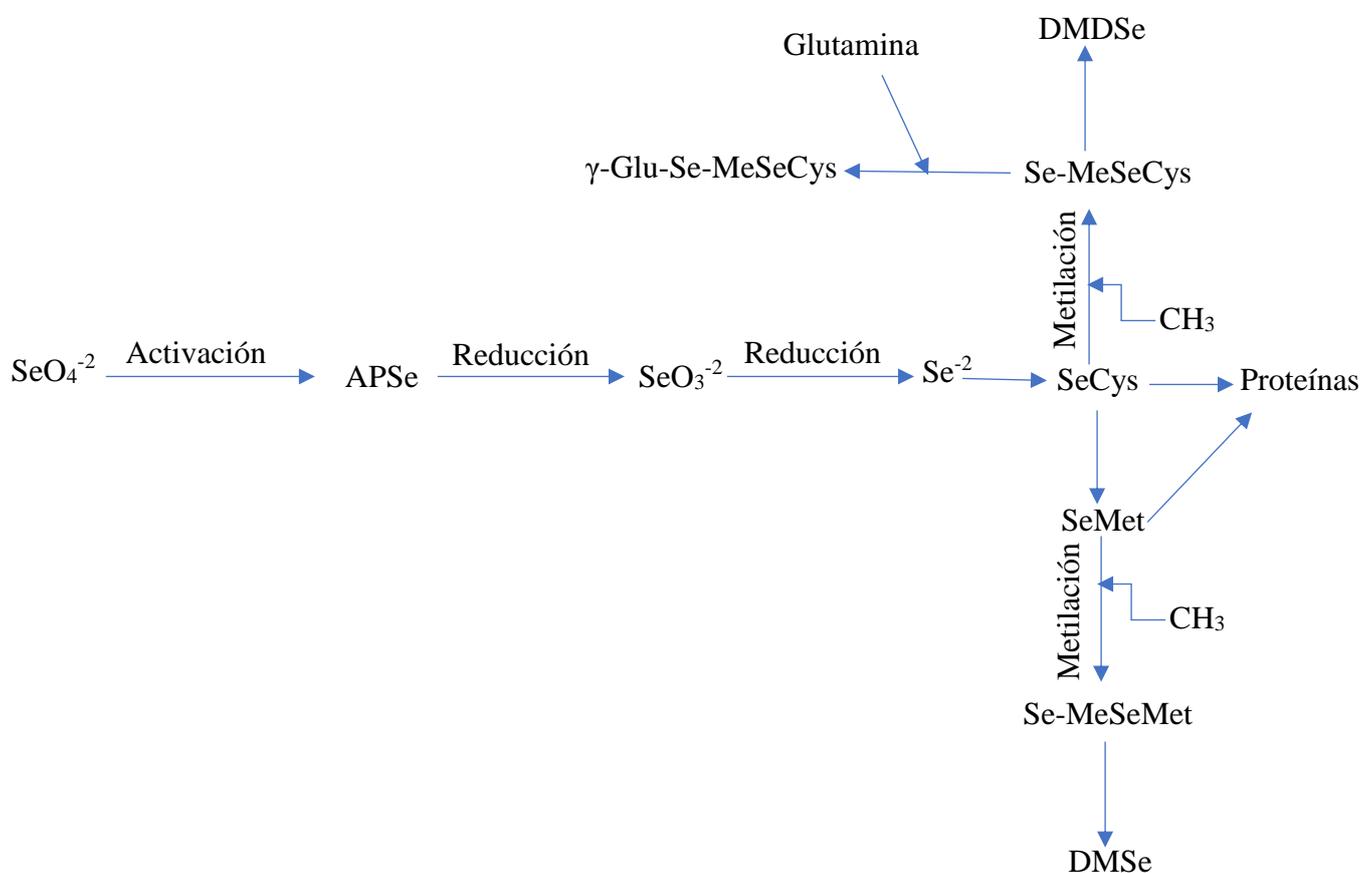
Las plantas que son acumuladoras primarias a su vez presentan altas cantidades de Se con respecto al S, como así también una alta concentración de Se en los brotes con respecto a las raíces (Galeas et al., 2007; White et al., 2007). Esto muestra que existe una alteración en el proceso de transporte de Se y S, lo cual podría indicar que este tipo de plantas presentan transportadores específicos para el Se bajo la forma predominante de SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (Zhu et al., 2009).

Por otro lado, la distribución del Se en las plantas no sólo depende de la forma de Se utilizada en la suplementación sino también de otros factores como la etapa del desarrollo en la que se encuentra la planta, la especie y la presencia de otros elementos como el S. Así se ha observado que en plantas no acumuladoras de Se en la etapa de madurez, la concentración de Se es similar en granos y raíces, pero muy baja en las hojas (Knight and Beath, 1937), mientras que, en plantas acumuladoras, en una etapa temprana del desarrollo, el Se permanece mayoritariamente en las hojas y cuando estas plantas maduran este es transportado hacia las semillas (Knight and Beath, 1937). Dichos aspectos son muy importantes a considerar para el desarrollo de plantas suplementadas con Se en donde no todos los órganos de las plantas son comestibles.

#### **1.1.4-METABOLIZACIÓN DE Se EN LAS PLANTAS**

Como se mencionó en la sección anterior las plantas pueden absorber Se en forma de SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup> y SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>. El SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup> permanece en la raíz donde es rápidamente metabolizado en diferentes especies orgánicas de Se como SeMet, hidrato de Se-oxido- Se-metionina (SeOMet) y otras formas insolubles (Li et al., 2008). Mientras que el SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup> es

metabolizado a través de la misma ruta metabólica que  $\text{SO}_4^{-2}$ , dado que son químicamente análogos (Gupta and Gupta, 2017). La Figura 1.1.2 muestra un esquema de la metabolización de  $\text{SeO}_4^{-2}$  en las plantas. Una vez que el  $\text{SeO}_4^{-2}$  es absorbido desde suelo, por los transportadores de  $\text{SO}_4^{-2}$ , este es transportado rápidamente hacia las hojas sin sufrir ningún tipo de modificación química (de Souza et al., 1998). Una vez que se encuentra en las hojas, el  $\text{SeO}_4^{-2}$  ingresa a los cloroplastos donde es metabolizado por diferentes enzimas que corresponden a la ruta metabólica del  $\text{SO}_4^{-2}$  (Terry et al., 2000).



**Figura 1.1.2: Metabolización de  $\text{SeO}_4^{-2}$  en plantas.** Abreviaciones: APSe, 5'-fosfoselenato de adenosina; SeCys, selenocisteína; SeMet, selenometionina; Se-MeSeCys, selenometilselenocisteína;  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys,  $\gamma$ -glutamil-Se-metilselenocisteína; Se-MeSeMet, selenometilselenometionina; DMDSe, dimetildiseleniuro; DMSe, dimetilseleniuro. Basado en (Broadley et al., 2012) y (Terry et al., 2000).

El primer paso es la activación del  $\text{SeO}_4^{-2}$  por la ATP sulfurilasa produciendo fosfoselenato de adenosina (APSe) (Schiavon et al., 2015). El APSe es luego reducida a

$\text{SeO}_3^{-2}$  por la APS reductasa. Seguidamente  $\text{SeO}_3^{-2}$  es reducido a seleniuro ( $\text{Se}^{-2}$ ) en forma no enzimática. El glutatión reducido (GSH) actúa como reductor en este caso (Sors et al., 2005). Finalmente,  $\text{Se}^{-2}$  es transformado en SeCys, actuando el complejo cisteína sintasa como catalizador, y en SeMet a través de la ruta de biosíntesis de la metionina (Met) (Terry et al., 2000). Estos aminoácidos son incorporados a proteínas sustituyendo a cisteína (Cys) y a Met respectivamente (Brown and Shrift, 1982). Esto ocurre en plantas no acumuladoras donde esta sustitución genera toxicidad debido a que estas proteínas no presentan las mismas funciones biológicas que aquellas que contienen S (Brown and Shrift, 1982).

Las plantas acumuladoras tienen la capacidad de metilar a SeCys y SeMet impidiendo su incorporación a proteínas, evitando así los efectos tóxicos antes mencionados (Neuhierl and Böck, 1996; Sors et al., 2009). De esta manera SeCys es transformada en importantes aminoácidos como la  $\gamma$ -Glu-Se-MeSecys y Se-MeSecys conocidos por ser agentes anticancerígenos (LeDuc et al., 2006).

Las plantas también tienen la capacidad de volatilizar al Se, produciendo compuestos volátiles de la misma forma que lo hace con S. El principal compuesto volátil producido es el dimetilselenuro (DMSe) cuyo precursor es SeMet (Lewis et al., 1974). Otro compuesto volátil producido es dimetildiselenuro (DMDS) que es producido por la metilación y posterior oxidación de SeCys (Broadley et al., 2010).

La velocidad de volatilización de Se varía entre diferentes especies de plantas y también depende de la forma en que Se es suplido. De esta manera, se ha reportado que en arroz, brócoli y repollo, suplidos con  $\text{SeO}_4^{-2}$ , la volatilización estuvo en el rango de 200 a 350  $\mu\text{g Se m}^{-2}$  de área foliar (Terry et al., 1992). Mientras que en cebolla, lechuga y remolacha la volatilización fue menor a 15  $\mu\text{g Se m}^{-2}$  de área foliar (Terry et al., 1992).

Además, en plantas como la mostaza de la India la volatilización fue mayor en los casos donde fueron suplidas con  $\text{SeO}_3^{-2}$  (de Souza et al., 1998). Este es un aspecto importante a considerar a la hora de seleccionar la especie de planta que se desea suplementar, puesto que una volatilización significaría pérdidas de Se.

### 1.1.5-EFECTOS BENEFICIOSOS DEL Se PARA LAS PLANTAS

Si bien Se no es esencial para las plantas se ha demostrado que a bajas concentraciones, este elemento puede ser beneficioso, aumentando la productividad (Kaur et al., 2014). Pero esto depende si las plantas tienen la capacidad de acumular Se, dado que se ha documentado que a determinadas concentraciones de Se se promovía el crecimiento de las plantas acumuladoras mientras que en plantas no acumuladoras el mismo rango de concentraciones lo inhibía considerablemente (Kaur et al., 2014; Singh et al., 1980).

En plantas como la papa (*Solanum tuberosum* L.) y la mostaza de la India (*Brassica juncea* L) la aplicación conjunta de Se y nitrógeno (N) promovió el crecimiento de la planta, el rendimiento de tubérculos y la calidad de las plantas con respecto a las plantas control (Singh et al., 1980; Turakainen, 2007; Yassen et al., 2011). En la papa también se observó un aumento en la concentración de almidón (Turakainen, 2007). Es decir que la acción conjunta del N y el Se promueve a los factores de crecimiento y de calidad (Kaur et al., 2014).

Además, se ha reportado que tratamientos de suplementación a  $1,0 \text{ mg Se L}^{-1}$  promueven la producción de semilla y la germinación (Lyons et al., 2009). Asimismo, la acción conjunta del  $\text{SeO}_4^{-2}$  y  $\text{SeO}_3^{-2}$  aumentó el rendimiento y la calidad del té (*Camellia sinensis*) y el café (*Coffea arabica* L.) (Hu et al., 2001; Mazzafera, 1998).

El Se también actúa como un antioxidante en las plantas (Kaur et al., 2014). En plantas de raigrás (*Lolium perenne*) tratadas con Se se reportó un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa donde Se forma parte del centro activo de esta enzima (Hartikainen et al., 2000). Este incremento en la actividad disminuyó la peroxidación de los lípidos favoreciendo el crecimiento de las plantas (Hartikainen et al., 2000). En plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) enriquecidas con Se, el aumento en la actividad antioxidante promovió el crecimiento de plántulas senescentes (Xue et al., 2001). En plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) y frutilla (*Fragaria*), la capacidad antioxidante de Se aumentó la eficiencia fotosintética y disminuyó el daño causado por la radiación UV (Germ et al., 2005; Valkama et al., 2003). En sorgo (*Sorghum*) y soja (*Glycine max*), el Se desempeñó un papel protector contra el stress provocado por las altas temperaturas mejorando las defensas antioxidantes (Djanaguiraman et al., 2010, 2005).

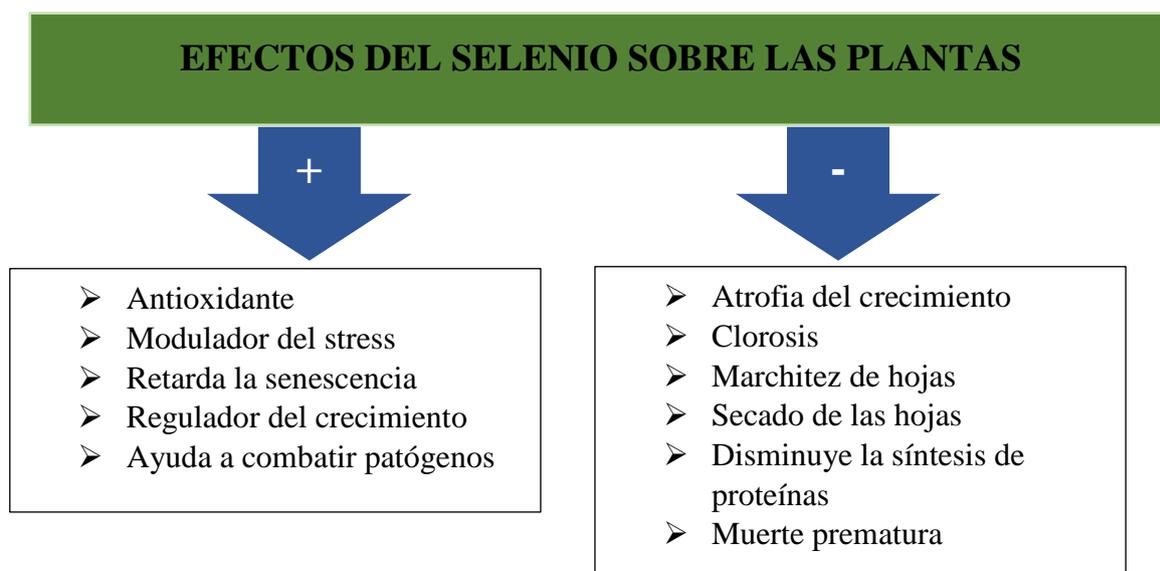
El Se también funciona como un agente protector contra diversos stress del tipo abióticos en las plantas (Kaur et al., 2014). Algunos de ellos son la sequía, altas temperaturas, senescencia, presencia de metales pesados, elevado contenido salino, stress por frío, stress hídrico y sequedad (Chu et al., 2010; Djanaguiraman et al., 2010; Feng et al., 2013; Hartikainen et al., 2000). Muchos de estos tipos de stress aumentan la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan severos daños en las plantas (Mittler, 2002). Debido a que la presencia de Se aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa que protege a los organismos contra los daños oxidativos generados por ROS es posible contrarrestar estos daños al tratar a las plantas con Se (Feng et al., 2013).

Además, el Se es un elemento que también tiene la capacidad formar compuestos de asociación con metales pesados como Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Plata (Ag) y Talio (Tl), protegiendo de este modo a las plantas contra los efectos adversos que estos metales

podrían causar (Whanger, 1992). Este efecto protector ha sido reportado en diferentes plantas como las de arroz (*Oryza sativa*), arvejas (*Pisum sativum*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Tan et al., 2000).

Las concentraciones de Se en plantas acumuladoras a menudo producen efectos tóxicos para una gran variedad de herbívoros y patógenos perjudiciales para las plantas (Kaur et al., 2014). Este tipo de plantas almacenan Se en tejidos y órganos que son vulnerables a los ataques, como una estrategia defensiva (Kaur et al., 2014). Por ejemplo, *Stanleya pinnata* almacena Se en la periferia de las hojas y en las células epidérmicas; *A. bisulcatus* almacena Se principalmente en tricomas, que están asociados con la defensa de la planta (Freeman et al., 2006; Valdez Barillas et al., 2012).

Si bien no existe evidencia de que Se sea esencial para las plantas, este elemento tiene un efecto protector que depende de su concentración y de la forma química en que es aplicado (especie). La Figura 1.1.3 ofrece un resumen de los efectos benéficos del Se hacia las plantas que han sido reportados en la literatura.



**Figura 1.1.3: Efectos positivos y negativos del Selenio sobre las plantas.** Basado en (Kaur et al., 2014)

### 1.1.6-TOXICIDAD DEL Se EN PLANTAS

Los niveles tóxicos de Se en los tejidos vegetales generalmente superan los 5 mg Se kg<sup>-1</sup>, pero entre los cultivos agrícolas, la fitotoxicidad de Se es variable (Mikkelsen et al., 1989; Reilly, 1996). Los efectos tóxicos sobre las plantas expuestas a Se incluyen atrofia del crecimiento, clorosis, marchitez y secado de las hojas, muerte prematura de las plantas y disminución de la síntesis de proteínas (Figura 1.1.3) (Mengel and Kirkby, 1978).

La toxicidad del Se o selenosis en las plantas ocurre cuando se excede la concentración óptima de Se. El Se causa toxicidad por dos mecanismos, uno de los cuales es por fallas en las estructuras de proteínas y otro por inducir estrés oxidativo (Gupta and Gupta, 2017). Ambos mecanismos son conocidos por ser muy dañinos para las plantas.

Las proteínas malformadas se forman debido a la incorporación errónea de SeCys y SeMet en lugar de Cys y Met en la cadena proteica (Gupta and Gupta, 2017). En comparación con SeMet, la sustitución de SeCys es más reactiva y perjudicial para el funcionamiento de la proteína (Gupta and Gupta, 2017). En una cadena proteica, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estructura y función de la proteína, y ayudan en la formación de puentes disulfuro, catálisis enzimática y sitio de unión al metal (Hondal et al., 2013). Por lo tanto, el reemplazo de Cys con SeCys es perjudicial para la estructura y función de la proteína ya que SeCys es más grande, reactivo y más fácilmente desprotonable que la Cys (Hondal et al., 2013). De este modo se pudo observar como la incorporación de SeCys afectó la función de algunas enzimas en las plantas en forma significativa como en el caso de la función de metionina sulfóxido reductasa que se deterioró después de la sustitución con SeCys (Châtelain et al., 2013). La sustitución de SeCys distorsiona la estructura terciaria de la proteína debido a la mayor formación de puentes de diseleniuro y al potencial redox alterado que afecta la cinética de la enzima

(Hondal et al., 2013). Las proteínas del clúster Fe-S del cloroplasto y los transportadores de electrones mitocondriales son propensos a la sustitución por SeCys (Balk and Pilon, 2011). El grupo Fe-Se tiene un tamaño más grande y no se ajusta adecuadamente a las apoproteínas (Gupta and Gupta, 2017). La actividad de la nitrogenasa de la *Klebsiella pneumonia* disminuyó cinco veces después del reemplazo del grupo Fe-S con Fe-Se (Hallenbeck et al., 2009). Sin embargo, en otro estudio, la reacción de sustitución demostró ser beneficiosa en enzimas que protegen contra el stress oxidativo como la peroxidasa en *Citrus X sinensis* (Hazebrouck et al., 2000).

En dosis altas, el Se actúa como prooxidante y genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo en las plantas (Gupta and Gupta, 2017). En general, bajo el estrés se observa un nivel reducido de glutatión (principal compuesto que protege a las células del estrés oxidativo), excepto en las plantas acumuladoras de Se donde se observan niveles elevados (Grant et al., 2011; Hugouvieux et al., 2009). Estudios han demostrado que la reducción en la concentración de glutatión y formación de ROS están ampliamente relacionados en plantas expuestas a altas dosis de Se, generando daños en las mismas por el aumento en la peroxidación de los lípidos como fue reportado en trigo (Grant et al., 2011; Łabanowska et al., 2012).

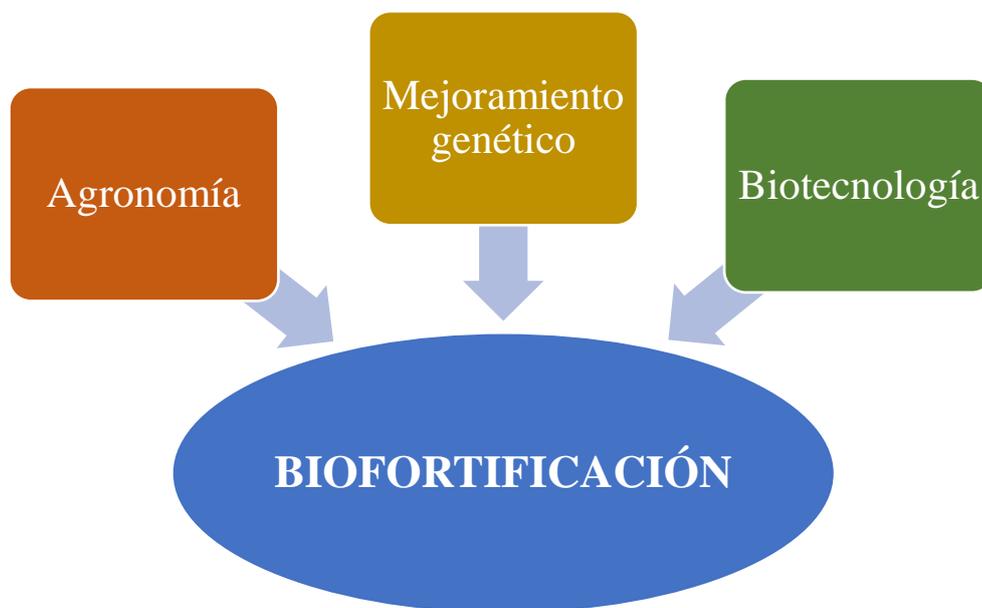
En las plantas también se puede observar como el Se presenta un comportamiento dual ya que este elemento es beneficioso dentro un dado rango de concentraciones para diferentes especies de plantas, pero al sobrepasar estas concentraciones óptimas este se vuelve tóxico sobre todo para aquellas plantas que son no acumuladoras y no poseen ningún mecanismo de defensa contra la selenosis. Por lo que al desarrollar plantas enriquecidas con Se, es importante considerar la especie de plantas, las concentraciones de Se y las formas de Se utilizadas en la suplementación.

### 1.1.7-BIOFORTIFICACIÓN DE PLANTAS CON Se

La biofortificación es una práctica de enriquecimiento de los productos alimenticios agrícolas con ciertos nutrientes, por ejemplo, Se, para aumentar la ingesta dietética a través del fitomejoramiento, la ingeniería genética y la manipulación de prácticas agronómicas (Kieliszek and Błażej, 2013).

La biofortificación es una técnica agrícola segura y económica, cuyo objetivo es hacer frente a la deficiencia de un nutriente particular en la dieta y aumentar el contenido de un micronutriente, por ejemplo Se, en la porción comestible de la planta (Nestel et al., 2006). La biofortificación con Se busca aumentar sustancialmente los contenidos de este elemento en los productos alimenticios agrícolas para combatir la deficiencia de Se que padecen algunas partes del mundo y para aprovechar los efectos benéficos del Se sobre la salud (Zhu et al., 2009).

Las estrategias de biofortificación implican la mejora de las características agronómicas y el contenido nutricional de los cultivos a través de la agronomía, el mejoramiento de plantas y la biotecnología (Figura 1.1.4).



**Figura 1.1.4: Diferentes enfoques en biofortificación.**

Las estrategias agronómicas para biofortificar los cultivos incluyen el uso de fertilizantes y manejo del suelo para aumentar la cantidad de nutrientes disponibles para la absorción de la planta (White and Broadley, 2009). Estas estrategias han sido exitosas en muchos casos, aunque las iniciativas globales o regionales aún no se han implementado ampliamente. El mejor ejemplo de biofortificación de cultivos alimentarios utilizando fertilizantes con Se proviene de Finlandia, este fue un estudio documentado en el que participó un país entero (Broadley et al., 2006). La adición de  $\text{SeO}_4^{2-}$  a los fertilizantes NPK para su uso en cultivos y pasturas fue el primer método probado para aumentar la concentración de Se en plantas comestibles (Lyons et al., 2005b). Así se desarrollaron programas de fertilización similares a los de Finlandia en otros países, con áreas de baja concentración de Se en suelo, como Nueva Zelanda, Australia y China (Garcia-Banuelos et al., 2011). Cabe mencionar que la fertilización con Se no sólo se implementó para disminuir los problemas de deficiencia de Se en humanos sino también para mejorar la calidad y el rendimiento de los cultivos (Hartikainen, 2005). En el apartado 1.1.5 de este documento se presentaron los efectos benéficos del Se en las plantas que producen una mejora en la calidad y en el rendimiento. Otro aspecto importante que considerar en esta metodología de biofortificación es la biodisponibilidad del Se por parte de la planta. La biodisponibilidad de Se en el suelo depende de la presencia de óxidos como los de hierro (Fe) y de aluminio (Al) que son capaces de adsorber fuertemente a  $\text{SeO}_3^{2-}$ , la presencia de aniones como  $\text{SO}_4^{2-}$  que compiten por los mismos transportadores, y del pH y el estado redox que afectan su movilidad (Hartikainen, 2005). Algunos estudios demostraron que, aunque el rango de Se en el suelo fue de 245 a 590  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , la concentración de Se en el trigo estuvo en el rango de 16-44  $\text{ng Se g}^{-1}$  (Lyons, 2010). Por lo que hay que considerar las características del suelo para determinar si es posible aplicar este tipo de metodologías. La aplicación foliar de Se es otra metodología empleada en la biofortificación la cual

consiste en rociar a los cultivos con sales de Se (Slekovec and Goessler, 2005). Esta metodología demostró ser un medio más eficiente que la aplicación de fertilizantes de Se en el suelo, evitando los problemas de movilidad y translocación de Se mencionados anteriormente, además de evitar el efecto tóxico a los ecosistemas que podría traer el uso prolongado de fertilizantes con Se en el suelo (Winkel et al., 2015). Excelentes resultados se encontraron en la biofortificación foliar de Se en arroz (*Oryza sativa*), zanahoria (*Daucus carota*) y papa (*Solanum tuberosum*) (Boldrin et al., 2013; Kápolna et al., 2009; Poggi et al., 2000).

Otra metodología empleada para biofortificar plantas con Se es la hidroponía, esta metodología consiste en agregar Se a la solución nutritiva en la que las plantas crecen (Jones Jr, 2016; Qingmao et al., 1998). La hidroponía es un sistema cerrado que permite un mejor control de la dosis de Se, evitando la hiperacumulación y los consecuentes efectos tóxicos tanto para las plantas como para los seres humanos (Pezzarossa et al., 2014). Algunos ejemplos exitosos de biofortificación a través de la hidroponía han sido en tomate (*Solanum lycopersicum*), ajo (*Allium sativum L*) y lechuga (*Lactuca sativa*) (Lee et al., 2006; Qingmao et al., 1998; Tsuneyoshi et al., 2006).

La biofortificación mediante fitomejoramiento aprovecha la diversidad genética natural de los cultivos para desarrollar nuevos cultivares con niveles más altos de nutrientes deseados (Garcia-Banuelos et al., 2011). Varios estudios han demostrado que esta clase de biofortificación puede mejorar el estado nutricional y que es económicamente viable (Bouis, 1999; Zapata-Caldas et al., 2009). En general, hay poca información sobre las diferencias varietales en la acumulación de Se para la mayoría de las especies de cultivos (Broadley et al., 2006). No obstante, se podría esperar que las plantas muestren una mayor variabilidad genotípica para los micronutrientes esenciales que para un elemento no esencial como Se; pero algunos estudios han demostrado una

variabilidad genética significativa en las partes comestibles de cultivos como soja, tomate y rábano (Combs, 2001; Garcia-Banuelos et al., 2011; Lyons et al., 2005a). Pero en casos como en las variedades de trigo se ha demostrado que la concentración de Se es determinada de forma abrumadora por la concentración de Se disponible en el suelo, influenciada por el pH, el potencial redox, y la presencia de ciertos óxidos y aniones como se mencionó anteriormente (Garcia-Banuelos et al., 2011). Por lo tanto, para producir trigo con mayor concentración de Se, la biofortificación agronómica puede ser una estrategia más práctica y productiva que tratar de generar una mejor eficiencia en absorción de Se en las distintas variedades (Lyons et al., 2005b).

La biofortificación a través de la biotecnología se emplea cuando hay ausencia de variación genética en el contenido de nutrientes entre las variedades, por lo que los enfoques transgénicos pueden ser una alternativa válida para la biofortificación de cultivos (Garcia-Banuelos et al., 2011). Por lo tanto, los avances en biología molecular se están explotando para diseñar cultivos mejorados. Esto es posible por el rápido desarrollo de la secuenciación del genoma, el mapeo físico de alto rendimiento, el análisis global de la expresión génica y el perfil de metabolitos en una variedad de organismos (Galili and Höfgen, 2002). Otra alternativa es la ingeniería metabólica donde se utilizan dos enfoques distintos para mejorar el contenido de minerales: aumentar la eficacia de la absorción y el transporte en los tejidos comestibles, y aumentar la capacidad de acumulación de minerales biodisponibles en la planta (Garcia-Banuelos et al., 2011). Con respecto al Se, la sobreexpresión de ATP sulfurilasa y/o genes implicados en la síntesis de glutatión aumentaron la acumulación de Se en *Brassica juncea* transgénica (Pilon-Smits et al., 1999). Los enfoques de ingeniería metabólica también se han empleado para aumentar la absorción de Se en las plantas y en el almacenamiento de formas no tóxicas de Se en las mismas (Garcia-Banuelos et al., 2011). Por ejemplo, la toxicidad de Se es causada por el

reemplazo en proteínas azufradas con Se formando SeCys por lo que se introdujo un gen de ratón que expresa una enzima SeCyslyase en el genoma de la canola (*Brassica juncea*) limitando así la acumulación de SeCys (Garifullina et al., 2003).

Existen numerosos enfoques y metodologías para la biofortificación con Se en plantas. La elección de uno u otro depende de las características del suelo, el tipo de planta y factores económicos. La Tabla 1.1.2 muestra un resumen con varios casos de biofortificación con Se en diferentes especies de plantas.

**Tabla 1.1.2:** Biofortificación con Se en diferentes especies de plantas.

Especie	Forma de Se utilizada para biofortificar	Concentración final de Se	Referencia
Nabo	SeO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	2,39–7,54 µg Se g <sup>-1</sup>	(Li et al., 2018)
Arroz	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,03 - 0,35 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Reis et al., 2018)
Tomate	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,6 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Zhu et al., 2018)
Trigo	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	166-187 µg Se kg <sup>-1</sup>	(Mathers et al., 2017)
Lechuga	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	26 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Diaz et al., 2007)
Achicoria	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	30 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Diaz et al., 2007)
Albaca	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	7,86 -150 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Hawrylak-Nowak, 2008)
Espinaca	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	12 mg Se kg <sup>-1</sup> peso fresco	(Zhu et al., 2004)
Remolacha	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	1393 µg Se por brote	(Hernández-Castro et al., 2015)
Papa	SeO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	2,1 a 7,4 µg Se g <sup>-1</sup>	(Turakainen et al., 2004)
Cebolla	SeO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> y SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,5 a 70,0 µg Se g <sup>-1</sup>	(Reilly et al., 2014)
Brócoli	SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,45 mg Se g <sup>-1</sup>	(HSU et al., 2011)
Puerro	SeO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> y SeO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	102 a 982 mg Se kg <sup>-1</sup>	(Lavu et al., 2012)

### 1.1.8-BIBLIOGRAFÍA

Aldosary, B.M., Sutter, M.E., Schwartz, M., Morgan, B.W., 2012. Case Series Of Selenium Toxicity From A Nutritional Supplement. Clin. Toxicol. 50, 57–64.

Balk, J., Pilon, M., 2011. Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants. Trends Plant Sci 16, 218-226.

Banuelos, G.S., Meek, D.W., Hoffman, G.J., 1990. The influence of selenium, salinity, and boron on selenium uptake in wild mustard. Plant Soil 127, 201–206.

Barberon, M., Berthomieu, P., Clairotte, M., Shibagaki, N., Davidian, J.C., Gosti, F., 2008. Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters SULTR1;1 and SULTR1;2. *New Phytol.* 180, 608–619.

Barrow, N.J., Whelan, B.R., 1989. Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. *J. Soil Sci.* 40, 29–37.

Berzelius, J.J., 1818. Lettre de M. Berzelius à M. Berthollet sur deux métaux nouveaux, in: *Annales de Chimie et de Physique, Série.* pp. 199–202.

Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244.

Bouis, H.E., 1999. Economics of enhanced micronutrient density in food staples. *F. Crop. Res.* 60, 165–173.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Ma, J.F., Rengel, Z., Zhao, F., 2012. Beneficial elements, in: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*. Elsevier, pp. 249–269.

Broadley, M.R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S.J., Hart, D.J., Hurst, R., Knott, P., McGrath, S.P., Meacham, M.C., Norman, K., Mowat, H., Scott, P., Stroud, J.L., Tovey, M., Tucker, M., White, P.J., Young, S.D., Zhao, F.-J., 2010. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant Soil* 332, 5–18.

Broadley, M.R., White, P.J., Bryson, R.J., Meacham, M.C., Bowen, H.C., Johnson, S.E., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Breward, N., 2006.

Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 169–181.

Brown, T.A., Shrift, A., 1982. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 59–84.

Châtelain, E., Satour, P., Laugier, E., Vu, B.L., Payet, N., Rey, P., Montrichard, F., 2013. Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3633–3638.

Chu, J., Yao, X., Zhang, Z., 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 136, 355–363.

Combs, G.F., 2001. Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.* 85, 517–547.

de Souza, M.P., Pilon-Smits, E.A.H., Lytle, C.M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T.S.U., Yeh, L., Terry, N., 1998. Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol.* 117, 1487–1494.

Diaz, K.E., Mensuali-Sodi, A., Serra, G., Malorgio, F., Tognoni, F., Ferrante, A., Pezzarossa, B., 2007. Effect of selenium addition on phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and ethylene production in leafy vegetables, in: *Advances in Plant Ethylene Research*. Springer, pp. 207–209.

Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, J.A., Bangarusamy, U., 2005. Selenium—an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272, 77–86.

Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Seppanen, M., 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 999–1007.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food

source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304–1323.

Duntas, L.H., Benvenga, S., 2015. Selenium: an element for life. *Endocrine* 48, 756–775.

Elrashidi, M.A., Adriano, D.C., Workman, S.M., Lindsay, W.L., 1987. Chemical equilibria of selenium in soils: a theoretical development<sup>1</sup>. *Soil Sci.* 144, 141–152.

Feng, R., Wei, C., Tu, S., 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 87, 58–68.

Finley, J.W., 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr. Rev.* 64, 146–151.

Freeman, J.L., Quinn, C.F., Marcus, M.A., Fakra, S., Pilon-Smits, E.A.H., 2006. Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Curr. Biol.* 16, 2181–2192.

Galeas, M.L., Zhang, L.H., Freeman, J.L., Wegner, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2007. Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in selenium hyperaccumulators and related nonaccumulators. *New Phytol.* 173, 517–525.

Galili, G., Höfgen, R., 2002. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metab. Eng.* 4, 3–11.

Garcia-Banuelos, M.L., A Hermosillo-Cereceres, M., Sánchez, E., 2011. The importance of selenium biofortification in food crops. *Curr. Nutr. Food Sci.* 7, 181–190.

Garifullina, G.F., Owen, J.D., Lindblom, S., Tufan, H., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2003. Expression of a mouse selenocysteine lyase in *Brassica juncea* chloroplasts affects selenium tolerance and accumulation. *Physiol. Plant.* 118, 538–544.

Germ, M., Kreft, I., Osvald, J., 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 43, 445–448.

Ghasemi, K., Bolandnazar, S., Tabatabaei, S.J., Pirdashti, H., Arzanlou, M., Ebrahimzadeh, M.A., Fathi, H., 2015. Antioxidant properties of garlic as affected by selenium and humic acid treatments. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 43, 173–181.

Grant, K., Carey, N.M., Mendoza, M., Schulze, J., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., Van Hoewyk, D., 2011. Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis* implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem. J.* 438, 325–335.

Gupta, M., Gupta, S., 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front. Plant Sci.* 7, 2074.

Hallenbeck, P.C., George, G.N., Prince, R.C., Thorneley, R.N.F., 2009. Characterization of a modified nitrogenase Fe protein from *Klebsiella pneumoniae* in which the 4Fe4S cluster has been replaced by a 4Fe4Se cluster. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 673–682.

Hartikainen, H., 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 309–318.

Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V., 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225, 193–200.

Hawrylak-Nowak, B., 2008. Enhanced selenium content in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by foliar fertilization. *Veg. Crop. Res. Bull.* 69, 63–72.

Hazebrouck, S., Camoin, L., Faltin, Z., Strosberg, A.D., Eshdat, Y., 2000.

Substituting selenocysteine for catalytic cysteine 41 enhances enzymatic activity of plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 28715–28721.

Heftmann, E., 2004. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods-Part B: Applications*. Elsevier.

Hernández-Castro, E., Trejo-Téllez, L.I., Gómez-Merino, F.C., Rodríguez-Mendoza, M.N., Sánchez-García, P., Robledo-Paz, A., 2015. Bioaccumulation of iron, selenium, nitrate, and proteins in chard shoots. *J. soil Sci. plant Nutr.* 15, 694–710.

Hondal, R.J., Marino, S.M., Gladyshev, V.N., 2013. Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1675–1689.

Hopper, J.L., Parker, D.R., 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant Soil* 210, 199–207.

HSU, F., Wirtz, M., Heppel, S.C., Bogs, J., Krämer, U.T.E., Khan, M.S., Bub, A., Hell, R., Rausch, T., 2011. Generation of Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on S metabolism. *Plant. Cell Environ.* 34, 192–207.

Hu, Q., Pan, G., Zhu, J., 2001. Effect of selenium on green tea preservation quality and amino acid composition of tea protein. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 344–346.

Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F., Lopez, V., Bourguignon, J., 2009. *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol.* 151, 768–781.

Jones Jr, J.B., 2016. *Hydroponics: a practical guide for the soilless grower*. CRC

press.

Kápolna, E., Hillestrøm, P.R., Laursen, K.H., Husted, S., Larsen, E.H., 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem.* 115, 1357–1363.

Kaur, N., Sharma, S., Kaur, S., Nayyar, H., 2014. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Arch. Agron. Soil Sci.* 60, 1593–1624.

Kieliszek, M., Błażej, S., 2013. Selenium: significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29, 713–718.

Knight, S.H., Beath, O.A., 1937. The occurrence of selenium and seleniferous vegetation in Wyoming. *Occur. selenium seleniferous Veg. Wyoming.*

Łabanowska, M., Filek, M., Kościelniak, J., Kurdziel, M., Kuliś, E., Hartikainen, H., 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings—EPR, enzymatic and fluorescence studies. *J. Plant Physiol.* 169, 275–284.

Lavu, R.V.S., Du Laing, G., Van De Wiele, T., Pratti, V.L., Willekens, K., Vandecasteele, B., Tack, F., 2012. Fertilizing soil with selenium fertilizers: impact on concentration, speciation, and bioaccessibility of selenium in leek (*Allium ampeloprasum*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 10930–10935.

LeDuc, D.L., AbdelSamie, M., MÓntes-Bayon, M., Wu, C.P., Reisinger, S.J., Terry, N., 2006. Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environ. Pollut.* 144, 70–76.

Lee, G.-J., Kang, B.-K., Kim, T.-I., Kim, T.-J., Kim, J.-H., 2006. Effects of different selenium concentrations of the nutrient solution on the growth and quality of

tomato fruit in hydroponics, in: XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Advances in Environmental Control, Automation 761. pp. 443–448.

Lewis, B.G., Johnson, C.M., Broyer, T.C., 1974. Volatile selenium in higher plants the production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of Se-methyl selenomethionine selenonium salt. *Plant Soil* 40, 107–118.

Li, H., McGrath, S.P., Zhao, F., 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* 178, 92–102.

Li, X., Li, B., Yang, Y., 2018. Effects of foliar selenite on the nutrient components of turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* Linn.). *Front. Chem.* 6, 42.

Lyons, G., 2010. Selenium in cereals: improving the efficiency of agronomic biofortification in the UK. *Plant Soil* 332, 1–4.

Lyons, G., Judson, G.J., Ortiz-Monasterio, I., Genc, Y., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D., 2005a. Selenium in Australia: selenium status and biofortification of wheat for better health. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 75–82.

Lyons, G., Ortiz-Monasterio, I., Stangoulis, J., Graham, R., 2005b. Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant Soil* 269, 369–380.

Lyons, G.H., Genc, Y., Soole, K., Stangoulis, J.C.R., Liu, F., Graham, R.D., 2009. Selenium increases seed production in Brassica. *Plant Soil* 318, 73–80.

Mathers, A.W., Young, S.D., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Crout, N.M.J., Bailey, E.H., 2017. Determining the fate of selenium in wheat biofortification: an isotopically labelled field trial study. *Plant Soil* 420, 61–77.

Mayland, H.F., James, L.F., Panter, K.E., Sonderegger, J.L., 1989. Selenium in seleniferous environments. *Selenium Agric. Environ.* 15–50.

Mazzafera, P., 1998. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. *Plant Soil* 201, 189–196.

Mengel, K., Kirkby, E.A., 1978. Principles of plant nutrition. *Princ. plant Nutr.*

Michalska-Kacymirow, M., Kurek, E., Smolis, A., Wierzbicka, M., Bulska, E., 2014. Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to selenium inorganic compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3717–3722.

Mikkelsen, R.L., Page, A.L., Bingham, F.T., 1989. Factors Affecting Selenium Accumulation by Agricultural Crops1. *Selenium Agric. Environ.* 65–94.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.

Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: a review. *Sci. Total Environ.* 400, 115–141.

Navarro-Alarcon, M., López-Martinez, M.C., 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Total Environ.* 249, 347–371.

Nestel, P., Bouis, H.E., Meenakshi, J. V, Pfeiffer, W., 2006. Biofortification of staple food crops. *J. Nutr.* 136, 1064–1067.

Neuhierl, B., Böck, A., 1996. On the Mechanism of Selenium Tolerance in Selenium-Accumulating Plants. *FEBS J.* 239, 235–238.

Parker, D.R., Page, A.L., Bell, P.F., 1992. Contrasting selenate-sulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. *Soil Sci. Soc.*

Am. J. 56, 1818–1824.

Pezzarossa, B., Rosellini, I., Borghesi, E., Tonutti, P., Malorgio, F., 2014. Effects of Se-enrichment on yield, fruit composition and ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown in hydroponics. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 165, 106–110.

Pilon-Smits, E.A.H., Hwang, S., Lytle, C.M., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., Terry, N., 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol.* 119, 123–132.

Poggi, V., Arcioni, A., Filippini, P., Pifferi, P.G., 2000. Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): Effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4749–4751.

Połatajko, A., Jakubowski, N., Szpunar, J., 2006. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 639–654.

Qingmao, S., Lihong, G., Shijun, L., 1998. Effect of Selenium on Quality of Hydroponics Lettuce [J]. *J. China Agric. Univ.* 3, 12.

Reilly, C., 1996. *Selenium in food and health*. Springer Science & Business Media.

Reilly, K., Valverde, J., Finn, L., Gaffney, M., Rai, D.K., Brunton, N., 2014. A note on the effectiveness of selenium supplementation of Irish-grown *Allium* crops. *Irish J. Agric. Food Res.* 91–99.

Reis, H.P.G., de Queiroz Barcelos, J.P., Junior, E.F., Santos, E.F., Silva, V.M., Moraes, M.F., Putti, F.F., dos Reis, A.R., 2018. Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. *J. Cereal Sci.* 79, 508–515.

Schiavon, M., Pilon, M., Malagoli, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2015. Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation—a comparison of *Stanleya pinnata* and *Brassica juncea* (Brassicaceae). *Front. Plant Sci.* 6, 2.

Schwarz, K., Foltz, C.M., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292–3293.

Singh, M., Singh, N., Bhandari, D.K., 1980. Interaction of selenium and sulfur on the growth and chemical composition of raya. *Soil Sci.* 129, 238–244.

Slekovec, M., Goessler, W., 2005. Accumulation of selenium in natural plants and selenium supplemented vegetable and selenium speciation by HPLC-ICPMS. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 17, 63–73.

Sors, T.G., Ellis, D.R., Salt, D.E., 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth. Res.* 86, 373–389.

Sors, T.G., Martin, C.P., Salt, D.E., 2009. Characterization of selenocysteine methyltransferases from *Astragalus* species with contrasting selenium accumulation capacity. *Plant J.* 59, 110–122.

Tan, Z., Chen, J., Xue, H., 2000. Studies on the role of selenium (Se) in decreasing Pb, Cd and Cr pollution to rice. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis* 23, 80–83.

Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H.P., Lobinski, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* 72, 1453–1470.

Terry, N., Carlson, C., Raab, T.K., Zayed, A.M., 1992. Rates of selenium

volatilization among crop species. *J. Environ. Qual.* 21, 341–344.

Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S., 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 51, 401–432.

Thiry, C., Ruttens, A., Pussemier, L., Schneider, Y.-J., 2013. An in vitro investigation of species-dependent intestinal transport of selenium and the impact of this process on selenium bioavailability. *Br. J. Nutr.* 109, 2126–2134.

Thomson, C.D., Robinson, M.F., 1990. Selenium content of foods consumed in Otago, New Zealand. *N. Z. Med. J.* 103, 130–135.

Tsuneyoshi, T., Yoshida, J., Sasaoka, T., 2006. Hydroponic cultivation offers a practical means of producing selenium-enriched garlic. *J. Nutr.* 136, 870S–872S.

Turakainen, M., 2007. Selenium and its effects on growth, yield and tuber quality in potato. *Julk. yliopisto, Sovelt. Biol. laitos.*

Turakainen, M., Hartikainen, H., Seppänen, M.M., 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5378–5382.

Valdez Barillas, J.R., Quinn, C.F., Freeman, J.L., Lindblom, S.D., Fakra, S.C., Marcus, M.A., Gilligan, T.M., Alford, E.R., Wangeline, A.L., Pilon-Smits, E.A.H., 2012. Selenium Distribution and Speciation in the Hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus* and Associated Ecological Partners. *Plant Physiol.* 159, 1834–1844.

Valkama, E., Kivimäenpää, M., Hartikainen, H., Wulff, A., 2003. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria× ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agric. For. Meteorol.* 120, 267–278.

Whanger, P.D., 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 223–232.

Whanger, P.D., 1992. Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 6, 209–221.

White, P.J., Bowen, H.C., Marshall, B., Broadley, M.R., 2007. Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define ‘Se-accumulator’ plants. *Ann. Bot.* 100, 111–118.

White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R.E., Meacham, M.C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L.J., 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55, 1927–1937.

White, P.J., Broadley, M.R., 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.* 182, 49–84.

Winkel, L.H.E., Vriens, B., Jones, G.D., Schneider, L.S., Pilon-Smits, E., Bañuelos, G.S., 2015. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review. *Nutrients* 7, 4199–4239.

Wu, D., Sun, S., 2016. Speciation analysis of As, Sb and Se. *Trends Environ. Anal. Chem.* 11, 9–22.

Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V., 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237, 55–61.

Yassen, A.A., Safia, M.A., Sahar, M.Z., Zaghloul, M., 2011. Impact of nitrogen fertilizer and foliar spray of selenium on growth, yield and chemical constituents of potato plants. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5, 1296–1303.

Zapata-Caldas, E., Hyman, G., Pachón, H., Monserrate, F.A., Varela, L.V., 2009. Identifying candidate sites for crop biofortification in Latin America: case studies in Colombia, Nicaragua and Bolivia. *Int. J. Health Geogr.* 8, 29.

Zayed, A., Lytle, C.M., Terry, N., 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206, 284–292.

Zhang, X., Shi, B., Spallholz, J.E., 1993. The selenium content of selected meats, seafoods, and vegetables from Lubbock, Texas. *Biol. Trace Elem. Res.* 39, 161–169.

Zhu, Y.-G., Huang, Y., Hu, Y., Liu, Y., Christie, P., 2004. Interactions between selenium and iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) in solution culture. *Plant Soil* 261, 99–105.

Zhu, Y.-G., Pilon-Smits, E.A.H., Zhao, F.-J., Williams, P.N., Meharg, A.A., 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci.* 14, 436–442.

Zhu, Z., Zhang, Y., Liu, J., Chen, Y., Zhang, X., 2018. Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit. *Food Chem.* 292, 9–15.

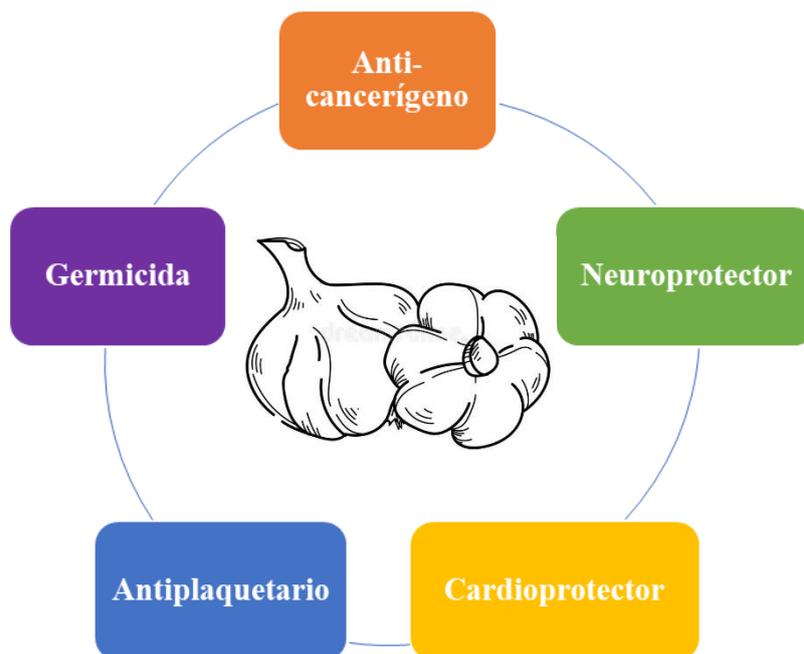
## 1.2-AJO (*Allium sativum* L.)

### 1.2.1-GENERALIDADES

El ajo (*Allium sativum* L.) es un miembro del género *Allium* que se cultiva en todo el mundo (Bhandari, 2012). Esta especie es originaria de Asia Central, y fue una de las primeras especies en ser cultivada (Londhe, 2011). Además, el ajo representa uno de los primeros ejemplos documentados de plantas empleadas para el tratamiento de enfermedades y mantenimiento de la salud (Bhandari, 2012; Locatelli et al., 2017). De hecho, las aplicaciones médicas del ajo han sido documentadas en textos médicos antiguos de Egipto, Grecia, Roma, China e India donde el ajo fue administrado para proporcionar fortaleza y aumentar la capacidad de trabajo de los obreros, y para mejorar el rendimiento de los Atletas olímpicos (Rivlin, 2001). Por lo que al ajo se lo ha reconocido como una especie valiosa que puede prevenir el cáncer, infecciones, y enfermedades neurodegenerativas y del corazón (Tsai et al., 2012). La Figura 1.2.1 muestra un resumen de los beneficios del ajo en la salud humana. La dosis óptima de ajo no se ha determinado, pero se recomienda que los adultos coman de uno a dos dientes de ajo crudo por día para obtener beneficios para la salud (Bhandari, 2012).

La mayor parte de la producción de ajo está destinada al consumo en fresco debido a que su industrialización no se encuentra muy desarrollada por los costos (Burba, 2013). Por lo que actualmente es un mercado con pocos competidores y una oportunidad para aumentar el valor agregado del ajo. El ajo industrializado se utiliza para la elaboración de diferentes productos, tales como el diente pelado que es demandado principalmente en establecimientos gastronómicos (Burba, 2013). Otro producto es el diente mínimamente procesado que es empleado en la elaboración de productos de cuarta gama donde destacan las ensaladas (Burba, 2013). Otras modalidades de industrialización son

el ajo picado para la elaboración de diferentes salsas como la provenzal, la pasta de ajo y el ajo en conserva (Burba, 2013).

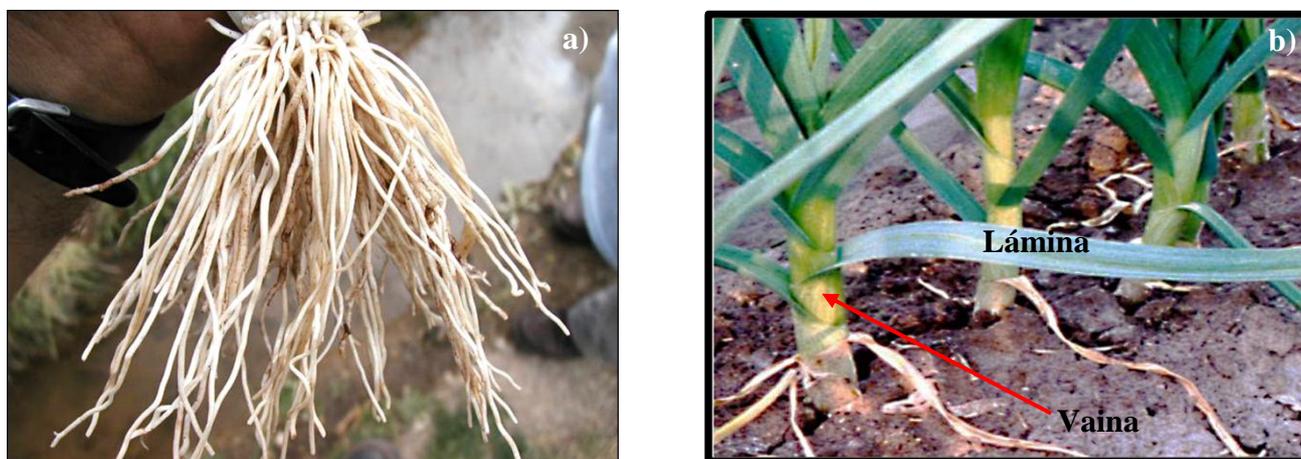


**Figura 1.2.1: Efectos benéficos del ajo en los seres humanos**

Otra oportunidad de industrializar el ajo y aumentar su valor agregado es la deshidratación de este para obtener fitofármacos y suplementos alimentarios aprovechando los numerosos beneficios para la salud que posee el consumo de ajo y que se detallaron anteriormente (Bhandari, 2012; Burba, 2013). Entendiéndose como fitofármacos aquellos que son elaborados exclusivamente con materia prima vegetal y el cual presenta una acción farmacológica definida y cuantificada (Santos et al., 2007). En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población utiliza medicina alternativa herbolaria (fitoterapia) como tratamiento paralelo a la medicina tradicional por lo que esta alternativa es una excelente oportunidad para aumentar el valor agregado del ajo (Burba, 2013).

### 1.2.2-MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

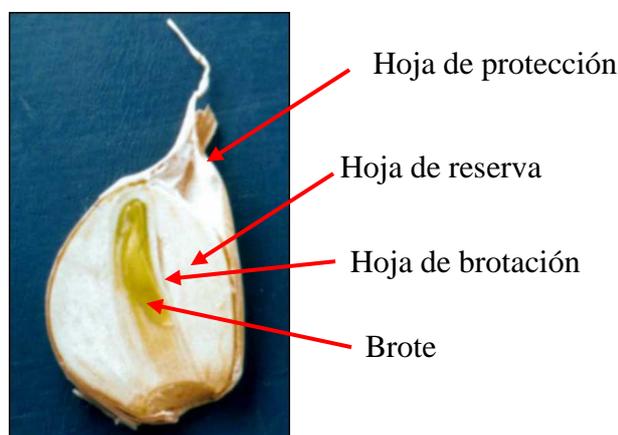
El ajo es una planta herbácea cuya arquitectura es relativamente alta y apretada (Fritsch and Friesen, 2002). Si bien comercialmente se trata como un cultivo anual, vegetativamente es una planta perenne (Burba, 2013). Sus raíces son muy abundantes y superficiales (Figura 1.2.2.a). Estas raíces se asemejan a una densa cabellera que puede extenderse lateralmente hasta 40 cm de la planta (Kamenetsky, 2007). El tallo es de muy pequeña altura y tiene forma de disco o platillo (Burba, 2013). Este se ubica en la base donde se insertan las hojas por lo que está bajo tierra (Burba, 2013). La parte aérea de la planta es un falso tallo formado por lo que se conoce como “rama” (Burba, 2013). Las hojas están compuestas por una vaina que se inserta en el tallo, esta permanece enrollada conformando el falso tallo de la planta, y por una lámina erecta en forma de V (Figura 1.2.2.b) (Maroto Borrego, 2002). El extremo de la hoja forma una punta que a menudo se presenta de color amarillo o seco (Maroto Borrego, 2002).



**Figura 1.2.2: Órganos de la planta de ajo.** a) Raíz y b) Hojas. Imágenes suministradas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

El principal órgano de cosecha de la planta es el bulbo que se encuentra bajo tierra. Este bulbo o “cabeza” está compuesto por 5 a 30 bulbillos o “dientes” (el número de

dientes depende de la variedad) (Maroto Borrego, 2002). Al momento de la cosecha, el bulbo se encuentra envuelto por las vainas de las hojas que se encuentran frescas por lo que es necesario que inmediatamente después de la cosecha las plantas de ajo se deshidraten naturalmente para poder conservar el bulbo (Burba, 2013). Este proceso es conocido como “curado del bulbo”(Burba, 2013). A su vez cada diente está formado por cuatro hojas modificadas (Figura 1.1.3). Las hojas externas se llaman “hojas de defensa”, estas son duras y de color variable (Pellegrini and Orioli, 2000). La hoja de reserva es aquella que es muy gruesa y de color blanco (Pellegrini and Orioli, 2000). En ella se encuentran todos los compuestos con actividad biológica que la planta produce. La hoja de brotación es blanca y muy dura lo que le permite abrirse camino a través del suelo para que una nueva planta de ajo emerja (Pellegrini and Orioli, 2000). Finalmente tenemos el brote formado por pequeñas hojas que serán las primeras hojas de la nueva planta de ajo cuando emerja (Pellegrini and Orioli, 2000).



**Figura 1.2.3: Corte longitudinal de un bulbillo o “diente”.** Imagen suministrada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La floración se produce al final del cultivo, aunque no todas las variedades de ajos florecen (Burba, 2013). Pero las variedades que si lo hacen presentan una inflorescencia por dentro del falso tallo envuelta por la hoja más joven (Burba, 2013). La inflorescencia

es una umbela simple en el extremo de un tallo floral conocida vulgarmente como “canuto”(Burba, 2013). Las flores que se forman en esta umbela son estériles y son reemplazadas por bulbillos más pequeños que los mencionados anteriormente denominados “aéreos”(Burba, 2013). Debido a que las flores son estériles, los ajos no producen semilla, por lo que su propagación se realiza a través de los bulbillos o dientes que son capaces de dar lugar a una nueva planta de ajo (Burba, 2013). La Figura 1.2.4 muestra imágenes de la inflorescencia de las plantas de ajo y de los bulbillos aéreos.



**Figura 1.2.4: Floración de las plantas de ajo.** a) Inflorescencia y b) Bulbillos aéreos. Imágenes suministradas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

### 1.2.3-TAXONOMÍA DEL AJO

La especie *Allium sativum* L. también se la ha denominado como “ajo común”, “ajo doméstico” o “ajo de huerta” (Burba, 2013). El nombre "*Allium sativum*" deriva de

la palabra celta "todos", que significa quemar o picadura, y del latín "sativum" que significa plantado o cultivado (Bhandari, 2012) .

El ajo a lo largo de la historia ha recibido otros nombres que todavía están en uso, como "penicilina rusa", "antibiótico natural", "planta talismán ", "Rustic's theriac", etc (Bhandari, 2012). La Tabla 1.2.1 muestra la clasificación taxonómica del ajo.

**Tabla 1.2.1:** Clasificación taxonómica del ajo (Fritsch and Friesen, 2002).

<b>Taxonomía</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Liliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Asparagales</i>
<b>Familia</b>	<i>Amaryllidaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Allioideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Allieae</i>
<b>Genero</b>	<i>Allium</i>
<b>Especie</b>	<i>Allium sativum</i>

#### 1.2.4-CICLO DE LA PLANTA DE AJO

El ajo es un cultivo plurianual, plantándose todos los años las mismas plantas a través de los bulbillos o dientes. El ciclo de crecimiento de la planta se puede dividir en una serie de etapas ecofisiológicas con características diferenciales en cuanto a la acumulación de biomasa y partición en la planta, y cuya duración depende de las condiciones ambientales (Figura 1.2.5) (Burba, 2013).

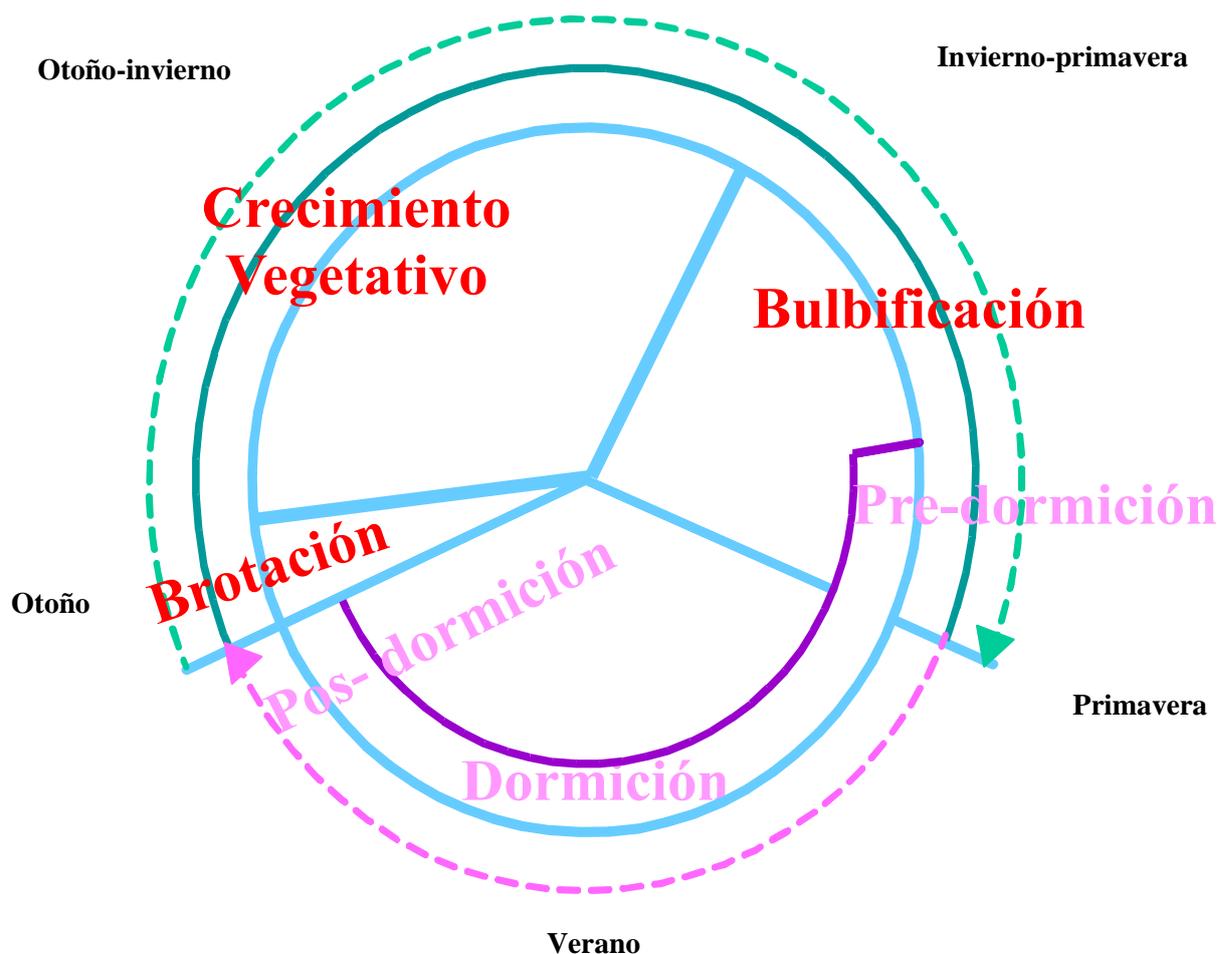


Figura 1.2.5: Ciclo de vida de una planta de ajo. (Burba, 2013)

Entre cada ciclo de crecimiento hay un período en que la planta no muestra ningún tipo de actividad, es decir que se encuentra en reposo por lo que este periodo se denomina dormición (Burba, 2013). Este período coincide con la época más adversa para la planta que es el verano (Burba, 2013). La evidencia clara de que la planta ha salido de la dormición y los bulbillos están listos para la brotación es el crecimiento del brote dentro del bulbillo. Por lo que existe el índice visual de superación de la dormición que es la relación entre el largo de la hoja de brotación y el largo de la hoja de reserva (Burba, 2013). En la figura 1.2.3 pueden visualizarse ambas hojas dentro del bulbillo. De esta manera cuando la longitud de la hoja de brotación ha alcanzado las tres cuartas partes de la longitud de la hoja de reserva, el bulbillo ya está listo para ser cultivado y comenzar la

brotación de este (Burba, 2013). Una vez que se realiza la plantación, el ciclo de crecimiento está formado por tres etapas. La primera es la brotación que va desde la plantación hasta que las plantas comienzan a emerger (Kamenetsky, 2007). La hoja de brotación se va abriendo camino a través del suelo a expensas de las reservas que se encuentran en el bulbillo (Kamenetsky, 2007). Esta etapa depende de la temperatura y la disponibilidad de agua (Burba, 2013). Esta etapa finaliza cuando emergen las hojas verdaderas (Burba, 2013). La segunda etapa es el crecimiento vegetativo cuya duración dependen de las temperaturas mínimas durante el invierno y del fotoperiodo que es alcanzado a finales del invierno (Burba, 2013). En esta etapa en forma simultánea las hojas y raíces comienzan a expandirse es decir que en esta etapa la biomasa se va acumulando (Kamenetsky, 2007). Además, esta etapa presenta cuatro fases: la de crecimiento inicial, el rápido crecimiento, el máximo crecimiento y finalmente la fase de senescencia (Burba, 2013). Es en esta etapa cuando las plantas asimilan la mayoría de los nutrientes y metaboliza la mayoría de los compuestos fotoasimilados (Burba, 2013).

Finalmente comienza la bulbificación, esta etapa depende del efecto fotoperiódico. Es decir que para que esta etapa tenga lugar es necesario la combinación de temperaturas en ascenso y días que se alarguen (más de 12 h de luz) (Mann, 1952). En esta etapa la planta comienza con la formación del bulbo que es conocido como “llenado del bulbo” y la senescencia de las hojas (Burba, 2013). Todos los compuestos fotoasimilados producidos en la etapa anterior son transportados hacia el bulbo (Burba, 2013). La formación del bulbo comprende dos etapas, la primera es el inicio del crecimiento de las yemas axiales de las hojas más jóvenes y la segunda etapa es la formación de las hojas de reserva que dan lugar a los bulbillos (Kamenetsky, 2007). Esta etapa comprende dos fases, la del rápido crecimiento del bulbo y la del crecimiento final del mismo (Burba, 2013).

Como se mencionó anteriormente no todas las variedades de ajo florecen, pero en los casos en que ocurre, esta se produce en forma simultánea con la bulbificación compitiendo con la misma (Pooler and Simon, 1993). Por lo que generalmente cuando el escapo florar aparece este es rápidamente cortado, proceso que se denomina descanutado (Burba, 2013). La Figura 1.2.6 muestra un esquema de las distintas etapas del crecimiento de la planta de ajo.

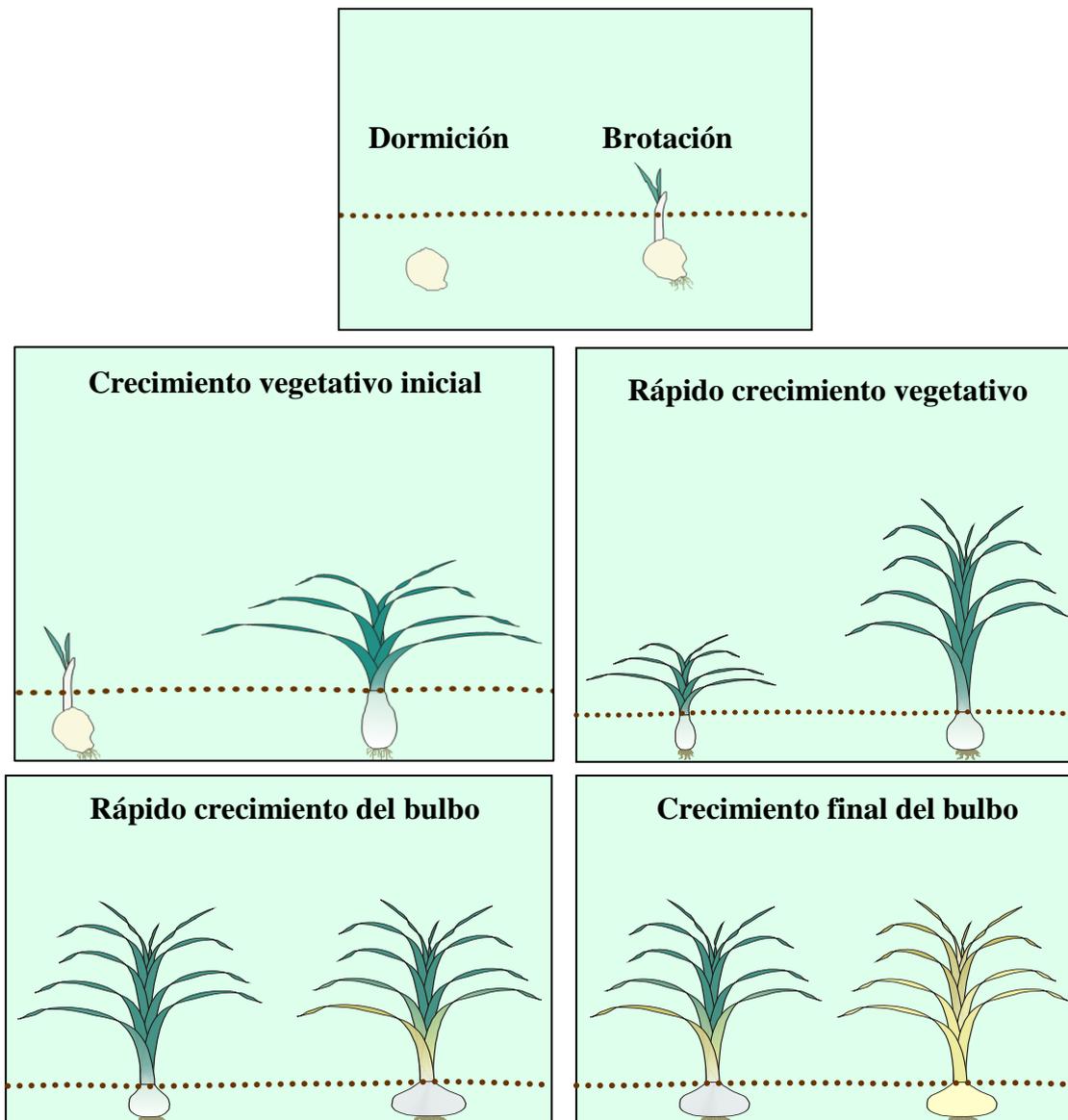


Figura 1.2.6: Etapas del crecimiento de la planta de ajo. (Burba, 2013)

**1.2.5-GRUPOS ECOFISIOLÓGICOS DEL AJO EN ARGENTINA**

Por varias generaciones, el ajo ha ido acumulando gran variabilidad a través de mutaciones, y de alteraciones estructurales de los cromosomas (Burba, 2013). A raíz de esto se han establecido cuatro grupos ecofisiológicos, que se diferencian en los requerimientos agroecológicos y en la longitud de la dormición (período entre un cultivo y el otro) (Burba, 2013). La tabla 1.2.2 muestra las diferencias entre los cuatro grupos ecofisiológicos.

**Tabla 1.2.2:** Clasificación ecofisiológica de clones de ajo (Burba, 2013).

<b>Grupos ecofisiológicos</b>	<b>Dormición</b>	<b>Clima</b>	<b>Duración del cultivo</b>
I. Asiáticos	Muy corta	Tropical	Corta
II. Subtropicales	Corta	Subtropical	Intermedia
III. Blancos	Media	Templado	Intermedia a larga
IV. Colorados	Larga	Templado-frío	Larga

Los grupos III y IV son los que ocupan la mayor superficie cultivada en Argentina (Burba, 2013). Dentro de estos grupos es posible distinguir seis tipos comerciales a los que pertenecen los cultivares inscriptos en Argentina. Estos seis tipos comerciales son: el blanco, el castaño, el colorado, el violeta, el rosado y el morado. Estos se diferencian en el color de las hojas de protección de los bulbillos entre otras características diferenciales. La tabla 1.2.3 presenta un resumen de los diferentes tipos comerciales y de sus características diferenciales.

**Tabla 1.2.3:** Características diferenciales de los tipos comerciales de ajo (Burba, 2013).

Características	Tipos comerciales					
	Rosado	Morado	Violeta	Blanco	Colorado	Castaño
<b>Grupo ecofisiológico</b>	II	II	III	III	IV	IV
<b>Forma del bulbo</b>	Cónica	Chata	Cónica	Chata	Globosa achatada	Globosa achatada
<b>Color del bulbo</b>	Blanco suave variegado	Blanco fuerte variegado	Blanco suave variegado	Blanco con estrías violetas	Blanco	Blanco fuerte variegado
<b>Color de los bulbillos</b>	Rosado	Beige	Beige	Blanco	Rojo	Castaño
<b>Número de dientes</b>	20 a 30	10 a 12	10 a 12	10 a 12	10 a 12	5 a 6
<b>Cuello</b>	Duro	Duro	Blando	Blando	Duro	Duro
<b>Ingreso al mercado</b>	Agosto	Octubre	Noviembre	Noviembre	Diciembre	Diciembre
<b>Conservación natural</b>	Escasa	Escasa	Escasa	Buena	Buena	Muy buena
<b>Conservación frigorífica</b>	Escasa	Escasa	Escasa	Muy buena	Excelente	Excelente
<b>Pungencia</b>	Baja	Baja	Mediana	Mediana	Mediana	Alta
<b>Olor</b>	Suave	Suave	Intenso	Intenso	Moderado	Muy suave
<b>Sabor</b>	Muy suave	Muy suave	Suave	Suave	Intenso	Muy intenso
<b>Destino</b>	Ensaladas	Ensaladas	Pescados y mariscos	Carnes blancas	Carnes rojas	Panes y cremas
<b>Propiedades nutraceuticas</b>	Escasas	Moderadas	Medianas	Altas	Muy altas	Muy altas

Actualmente en Argentina existen una gran cantidad de cultivares inscriptos en el Registro nacional de Cultivares que se diferencian en la precocidad (época de cosecha), pungencia, rendimiento y aptitud de uso (Burba, 2013). En la tabla 1.2.4 se detallan los cultivares argentinos inscriptos actualmente.

**Tabla 1.2.4:** Cultivares de ajo argentino inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares (Burba, 2013).

<b>Cultivar</b>	<b>Tipo comercial</b>	<b>Obtentor</b>
Rosado INTA Hsueh Chia Indonesia precoz	Rosado Rosado Rosado	INTA El Colorado (Formosa)
Colorado Mendoza Blanco Mendoza Violeta Francés Castaño INTA Fuego INTA Nieve INTA Perla INTA Lican INTA INCO 207 INCO 283 Morado INTA Sureño INTA Norteño INTA Gostoso INTA Plata INTA Rubí INTA Cristal INTA Gran Fuego INTA Killa INTA	Colorado Blanco Violeta Castaño Colorado Blanco Blanco Violeta Blanco Blanco Morado Colorado Blanco Colorado Colorado Blanco Colorado Blanco Colorado Blanco	INTA La Consulta (Mendoza)
Unión Tempranillo Peteco	Blanco Colorado Colorado	Universidad Nacional de Cuyo
Serrano Pampeano Alpa Suquia	Morado Morado Rosado	Universidad Nacional de Córdoba

### 1.2.6-IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE AJO EN ARGENTINA

Argentina ocupa un importante lugar en el marco de la producción y comercialización del ajo a nivel mundial, es el segundo exportador a nivel mundial de ajo (Burba, 2013; Camargo et al., 2010). A pesar de estar bien posicionada a nivel mundial y de la gran importancia regional del ajo en Argentina, este sector ha sufrido altibajos importantes en los costos, precios y en su competitividad internacional.

El ajo se cultiva en más de 20 provincias de Argentina, pero el 90% de la producción se encuentra en la Región de Cuyo, principalmente en la provincia de Mendoza (Burba, 2013). Solo el 30% de la producción se destina a consumo interno por lo que el desarrollo del sector depende principalmente de la competitividad que logre en los mercados internacionales (Burba, 2013).

Los precios internacionales están muy poco influenciados por la producción argentina de ajo porque a pesar de que Argentina es el segundo exportador a nivel mundial, la participación de nuestro país en el volumen total producido de ajo no es tan importante (Burba, 2013). Los valores alcanzados por este producto a nivel mundial son principalmente definidos por China que es el principal exportador, y por otros países productores y consumidores como los países europeos y México (Burba, 2013).

La gran ventaja que tiene Argentina en este contexto es la de ser el principal productor del Hemisferio Sur donde la producción puede salir al mercado en contra estación de otros productores, disminuyendo significativamente el número de competidores (Burba et al., 2003). Por este motivo en los países del Hemisferio Norte que son los principales consumidores, en la época que el ajo argentino es comercializado, sus políticas de protección a la producción nacional son más laxas, favoreciendo de esta manera al sector ajero argentino (Burba et al., 2003).

Al ajo se lo puede etiquetar como un producto regional y como tal representa una escasa importancia en los números globales de exportaciones del país, pero es muy importante para las economías locales, donde se asienta su producción, por la intensidad en el uso de insumos, servicios y mano de obra (Burba, 1997). De hecho, el sector ajero no solo tiene importancia económica sino social debido a la gran demanda de mano de obra. Se estima que se necesitan 2.300.000 jornales por año solo en las etapas de

producción primaria y empaque, lo que se traduce en 12.000 puestos de trabajo temporalizados y 10.000 puestos de trabajo anualizados (Burba, 1997). Mientras que en el uso de insumo y servicios este sector mueve más de 50 mil millones de dólares (Burba, 2013).

Por lo que se han propuesto una serie de medidas para ayudar al desarrollo del sector ajero argentino (Burba, 2013). Estas medidas son las siguientes:

- Establecer un sistema semillero que logre una estabilidad en la calidad de la producción e independizar el precio de la “semilla” (bulbillos en el caso del ajo que se utilizan para su cultivo) del precio comercial del ajo.
- Priorizar el cultivo de ajos “nobles”, de materiales mejorados, que permitan diferenciar el producto argentino.
- Promover el incremento de la demanda de ajo para el sector industrial aumentando el valor agregado del producto.
- Facilitar y promover la mecanización para disminuir el consumo de mano de obra.
- Promover fuentes de financiamiento para el sector.
- Lograr cierta independencia del resto de la economía nacional.
- Tender a la tecnificación para reducir el consumo de mano de obra.

Dentro de estas medidas, la más importante es la producción de ajo “noble” de gran calidad y calibre, y además con características diferenciales que permitan al sector competir en los mercados internacionales (Burba, 2013).

### **1.2.7-SELENIO Y EL AJO**

El ajo pertenece al género *Allium* por lo que puede considerarse como una planta hiperacumuladora de Se, de hecho, puede acumular hasta 1000 ppm de este elemento sin sufrir ningún problema de toxicidad (Bhandari, 2012; Sharma et al., 2007). Por lo que el

ajo es una muy buena alternativa para suplementar Se en la dieta humana a través de la biofortificación. De hecho, existen numerosos estudios en la literatura donde se ha biofortificado al ajo con Se obteniendo concentraciones entre 0,70 a 11,65 mg Se kg<sup>-1</sup> (Auger et al., 2004; Kapoor et al., 2012; Montes-Bayón et al., 2006; Poldma et al., 2011). Además, se demostró que la biofortificación con Se en los ajos no afecta significativamente la composición mineral y el tamaño de los bulbos, pero la actividad antioxidante de los bulbos sí fue incrementada cuando estos fueron biofortificados rociando las plantas con una solución de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y empleando concentraciones de 10 a 50 µg Se mL<sup>-1</sup> (Poldma et al., 2011).

Los conceptos inherentes a la biofortificación fueron expuestos en la sección 1.1.7 del presente documento por lo que no se ahondará en más detalles al respecto en este punto del texto.

El ajo puede acumular grandes cantidades de Se dado su similitud química con S, que es un elemento esencial para las plantas, y transformarlo en importantes especies orgánicas de Se como SeMet, SeCys, Se-MeSeCys y γ-Glu-SeMeSeCys, ampliamente reconocidos por su poder antioxidante (Auger et al., 2004; Broadley et al., 2012; Zhong et al., 2015). Por lo que el ajo biofortificado con Se reúne los beneficios para la salud tanto del Se como del ajo propiamente dicho, puesto que estas importantes especies orgánicas de Se presentan una alta biodisponibilidad para los seres humanos en el ajo (Ip and Lisk, 1993; Thiry et al., 2012). Estas Se-especies son análogas a las especies organoazufradas presentes en el ajo como los alquenilcisteín sulfóxidos (ACSOs) y γ-glutamil péptidos dado que Se sigue la misma ruta metabólica que S (Burba, 2013; El-Bayoumy et al., 2006). Estas especies organoazufradas son las responsables de la pungencia y flavor del ajo, y además destacan también sus propiedades antioxidantes, de hecho las especies con actividad biológica presentes en el ajo pertenecen en su gran

mayoría a este grupo (Burba, 2013; Gonzalez et al., 2009; Kubec and Dadáková, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que las especies orgánicas de Se presentan mayor poder antioxidante que las especies organoazufradas logrando, a diferencia de esta última, complejar metales como Fe responsables del daño oxidativo en los organismos, relacionado con la aparición de enfermedades como el cáncer (Battin et al., 2011; El-Bayoumy et al., 2006; Zimmerman et al., 2015). La formación de complejos es un mecanismo que evita que estos metales estén disponibles en las reacciones que generan daño oxidativo en los organismos (Zimmerman et al., 2015), por lo que el poder antioxidante del Se no se debe únicamente a que éste forma parte de enzimas importantes como la glutatión peroxidasa (Battin et al., 2011).

Por todo lo expuesto anteriormente, se podría aplicar la capacidad que tiene el ajo para acumular Se, y de esta manera aumentar los efectos benéficos que este trae sobre la salud para obtener un producto diferenciado y poder competir en los mercados internacionales, contribuyendo a satisfacer parte de las necesidades expuestas anteriormente del sector ajero argentino.

### **1.2.8- OTROS FITOQUÍMICOS PRESENTES EN EL AJO**

El ajo contiene una gran cantidad de fitoquímicos donde además de las especies orgánicas de Se antes mencionadas, se destacan los compuestos azufrados, varias enzimas, aminoácidos, polifenoles, etc., que son muy importantes desde el punto de vista biológico, estimándose que la mayoría de las propiedades benéficas con el consumo de ajo se deben a la acción conjunta de estos fitoquímicos (Tsai et al., 2012).

Los compuestos azufrados son los que se encuentran en mayor concentración, de hecho, es la especie del género *Allium* con mayor contenido de estos compuestos (Tsai et al., 2012). . El compuesto azufrado más importante en el ajo es la alicina(Ramirez et al.,

2017). La alicina es muy inestable en presencia de altas temperaturas o solventes orgánicos, por lo que cuando el ajo es procesado esta se transforma en otros compuestos, principalmente en ajoenos y viniltiínas (Burba, 2013; Soto Vargas et al., 2007). El ajoeno y viniltiínas tienen acción antitrombótica, previenen enfermedades cardiovasculares y son antioxidantes (Burba, 2013). Por lo que una ventaja que presenta el ajo es que al ser procesado este no pierde sus propiedades biológicas como si ocurre con otros alimentos (Burba, 2013).

El ajo también es una fuente de inulina, un carbohidrato de reserva energética que es empleado como suplemento de fibra en la dieta, por lo que previene enfermedades como la osteoporosis (porque incrementa la absorción de calcio) y la aterosclerosis (porque disminuye la síntesis de triglicéridos y el colesterol) (Burba, 2013). Además se pueden encontrar otros polisacáridos, como frútanos, que presentan características cardioprotectoras, antioxidantes y son capaces de estimular el sistema inmunológico (Burba, 2013; Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001).

En el ajo también podemos encontrar polifenoles como la allixina, estos son antioxidantes, antiinflamatorios, antivirales y antibacterianos (Burba, 2013; Li et al., 2018; Yang et al., 2004).

### **1.2.9-BIBLIOGRAFÍA**

Auger, J., Yang, W., Arnault, I., Pannier, F., Potin-Gautier, M., 2004. High-performance liquid chromatographic–inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“alliins” in garlic and onion grown in Se-rich soil. *J. Chromatogr. A* 1032, 103–107.

Battin, E.E., Zimmerman, M.T., Ramoutar, R.R., Quarles, C.E., Brumaghim, J.L., 2011. Preventing metal-mediated oxidative DNA damage with selenium compounds.

Metallomics 3, 503–512.

Bhandari, P., 2012. Garlic (*Allium sativum* L.): A review of potential therapeutic applications. *Int. J. green Pharm.* 6, 118.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Ma, J.F., Rengel, Z., Zhao, F., 2012. Beneficial elements, in: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*. Elsevier, pp. 249–269.

Burba, J.L., 2013. 100 Temas Sobre La Producción De Ajo, INTA. ed.

Burba, J.L., 1997. Panorama mundial y nacional de poblaciones y cultivares de ajo. Posibilidades de adaptación. *Burba, JL* 11–31.

Burba, J.L., Lopez, A.M., Lanzavechia, S., 2003. Sistema multimodal de empaque para exportación diferida de ajo termoprotegido a mercados del Hemisferio Norte. INTA. *Estac. Exp. Agropecu. La Consult. Doc* 75.

Camargo, A.B., Resnizky, S., Marchevsky, E.J., Luco, J.M., 2010. Use of the Argentinean garlic (*Allium sativum* L.) germplasm mineral profile for determining geographic origin. *J. food Compos. Anal.* 23, 586–591.

El-Bayoumy, K., Sinha, R., Pinto, J.T., Rivlin, R.S., 2006. Cancer chemoprevention by garlic and garlic-containing sulfur and selenium compounds. *J. Nutr.* 136, 864S–869S.

Fritsch, R.M., Friesen, N., 2002. Evolution, domestication and taxonomy. *Allium Crop Sci. Recent Adv.* 5–30.

Gonzalez, R.E., Soto, V.C., Sance, M.M., Camargo, A.B., Galmarini, C.R., 2009. Variability of solids, organosulfur compounds, pungency and health-enhancing traits in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars belonging to different ecophysiological groups. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10282–10288.

Ip, C., Lisk, D.J., 1993. Bioavailability of selenium from selenium-enriched

garlic.

Kamenetsky, R., 2007. Garlic: botany and horticulture. *Hortic. Rev.* THEN NEW YORK- 33, 123.

Kapoor, R., Nasim, S.A., Dhir, B., Mujib, A., 2012. Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of in vitro-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 48, 411–416.

Kubec, R., Dadáková, E., 2009. Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives—A comparative study. *J. Chromatogr. A* 1216, 6957–6963.

Li, X., Li, B., Yang, Y., 2018. Effects of foliar selenite on the nutrient components of turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* Linn.). *Front. Chem.* 6, 42.

Locatelli, D.A., Nazareno, M.A., Fusari, C.M., Camargo, A.B., 2017. Cooked garlic and antioxidant activity: correlation with organosulfur compound composition. *Food Chem.* 220, 219–224.

Londhe, V.P., 2011. Role of garlic (*allium sativum*) in various diseases-an overview. *J. Res. Opin.* 1.

Mann, L., 1952. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hilgardia* 21, 195–251.

Maroto Borrego, J. V, 2002. *Horticultura herbácea especial*.

Montes-Bayón, M., Molet, M.J.D., González, E.B., Sanz-Medel, A., 2006. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68, 1287–1293.

Olafsdottir, E.S., Ingólfssdottir, K., 2001. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med.* 67, 199–208.

Pellegrini, C.N., Orioli, G.A., 2000. Morfología del diente de ajo. Universidad Nacional del Sur.

Poldma, P., Tonutare, T., Viitak, A., Luik, A., Moor, U., 2011. Effect of selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 59, 5498–5503.

Pooler, M.R., Simon, P.W., 1993. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. *HortScience* 28, 1085–1086.

Ramirez, D.A., Locatelli, D.A., Torres-Palazzolo, C.A., Altamirano, J.C., Camargo, A.B., 2017. Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: cooked and biological fluids samples. *Food Chem.* 215, 493–500.

Rivlin, R.S., 2001. Historical perspective on the use of garlic. *J. Nutr.* 131, 951S–954S.

Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2007. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ. Int.* 33, 596–601.

Sharma, N., Kumar, A., Prakash, R., Prakash, N.T., 2007. Selenium accumulation and Se-induced anti-oxidant activity in *Allium cepa*. *Environ. Inform. Arch* 5, 328–336.

Soto Vargas, V., Camargo, A., González, R., Galmarini, C., 2007. Síntesis y purificación de ajoeno y su cuantificación en aceites comerciales de ajo. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar.* 39.

Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.-J., Pussemier, L., 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem.* 130, 767–784.

Tsai, C.-W., Chen, H.-W., Sheen, L.-Y., Lii, C.-K., 2012. Garlic: Health benefits and actions. *BioMedicine* 2, 17–29.

Yang, J., Meyers, K.J., van der Heide, J., Liu, R.H., 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6787–6793.

Zhong, N., Zhong, L., Hao, L., Luan, C., Li, X., 2015. Speciation of selenium in enriched garlic sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Lett.* 48, 180–187.

Zimmerman, M.T., Bayse, C.A., Ramoutar, R.R., Brumaghim, J.L., 2015. Sulfur and selenium antioxidants: challenging radical scavenging mechanisms and developing structure–activity relationships based on metal binding. *J. Inorg. Biochem.* 145, 30–40.

### 1.3-HIPÓTESIS GENERAL

Las investigaciones referidas a la acumulación, metabolización y transformación del Se en ajos son necesarias para evaluar correctamente la relación riesgo/beneficio derivada de la presencia de especies de Se en dicho alimento funcional, requiriendo el desarrollo de métodos analíticos modernos que incorporan técnicas instrumentales híbridas para una adecuada caracterización cuali- y cuantitativa.

### 1.4-HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. El ajo es capaz de acumular cantidades significativas de Se sin que se afecte su desarrollo.
2. La cantidad de Se acumulada es proporcional a la dosis de Se aplicada.
3. El ajo metaboliza el Se en aminoácidos con importante actividad biológica.
4. La capacidad de acumular y metabolizar el Se difiere dependiendo de las variedades de ajo.
5. El ajo es una buena alternativa para suplementar Se en la dieta humana.

### 1.5-OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la biofortificación de ajo (*Allium sativum* L.) con Se y determinar su metabolización mediante la caracterización cuali- y cuantitativa de las especies o formas químicas del elemento, así como las posibles transformaciones químicas, de manera de contribuir al posicionamiento de dicha hortaliza como un alimento de alto valor nutricional y con propiedades funcionales y beneficiosas para la salud.

### 1.6-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar ensayos en campo, invernáculo y laboratorio para estudiar la biofortificación con Se, en 4 cultivares de ajo argentino (*Allium sativum* L.): Nieve INTA

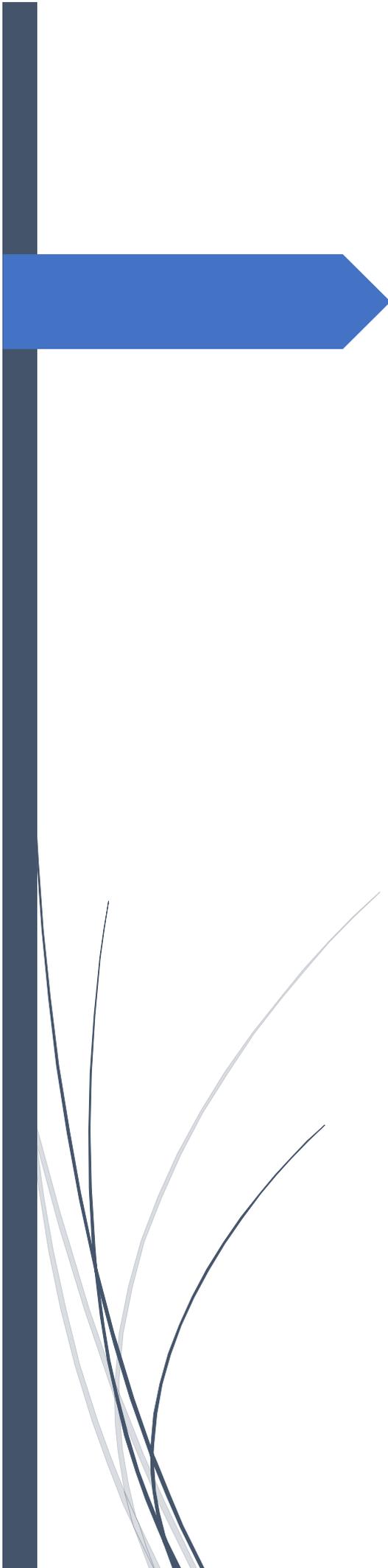
y Unión (tipo comercial “blancos”); Gostoso INTA y Rubi INTA (tipo comercial “colorados”), cultivadas a campo, mediante aplicaciones foliares de ese elemento.

2. Realizar ensayos en macetas para evaluar la acumulación y el ritmo de absorción de Se en un cultivar colorado, caracterizando las especies químicas presentes en la diferentes etapas del crecimiento de la planta.

3. Evaluar agronómicamente los componentes del rendimiento de los diferentes monoclonos fortificados, a la cosecha y en el producto comercial.

4. Estudiar la distribución y acumulación de Se total mediante técnicas instrumentales con detección elemental específica (ej. ETAAS, AFS o ICP-MS) en plantas de ajo biofortificadas.

5. Investigar la metalómica de Se en plantas de ajo mediante la evaluación analítica de las especies de Se con técnicas instrumentales híbridas de última generación (ej. HPLC-AFS o HPLC-ICP-MS) y herramientas instrumentales de caracterización molecular (ej. ESI-MS/MS o TOF-MS).



# **Capítulo 2: Materiales y Métodos**

## 2.1-REACTIVOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Las soluciones empleadas se prepararon con agua ultrapura (18 M $\Omega$  cm) producida con un sistema Milli-Q OSMOION (Apema S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Las soluciones patrón de especies inorgánicas de Se(IV) y Se(VI) (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) se prepararon con selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (99%) (Anedra, Buenos Aires, Argentina) y selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) (98%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), respectivamente. También, se prepararon soluciones patrón de Seleno-DL-metionina (SeMet) (Sigma-Aldrich), Semetilselenocisteína (Se-MeSeCys) (Sigma-Aldrich) y Selenocisteína (SeCys) (Sigma-Aldrich) de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

La solución de Se (169,89 g  $\text{L}^{-1}$ ) utilizada para la biofortificación con Se en los diferentes ensayos se preparó con 284,59 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \text{ L}^{-1}$  y 111,65 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \text{ L}^{-1}$  de Sigma.

En la digestión ácida previa a la determinación de Se total se empleó ácido clorhídrico (37% (p/p)) y ácido nítrico (65% (p/p)) de Merck (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la digestión de las muestras de ajo por microondas se empleó ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65% (p/p) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (p/p) de Merck (New Jersey, EE. UU.). Las soluciones estándar de Mg, Zn, Mn, Cu, Fe, P y S se prepararon a partir de soluciones madre (1000 mg  $\text{L}^{-1}$ ) por simple dilución con agua ultrapura. Los reactivos empleados en la preparación de estas soluciones madre fueron todos de Merck.

Una solución estándar mono-elemental de Rodio ( $^{103}\text{Rh}$ ) de Perkin Elmer Pure Plus (Norwalk, USA) se empleó como estándar interno durante la determinación de metales por ICP-MS.

Una solución 50 mM de Hidróxido de sodio (98%) (Sigma-Aldrich) se empleó para la extracción de Se-proteínas. Una solución 0,7% (p/v) de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich) se empleó también para la determinación total de Se por HG-AFS. La misma fue preparada en 0,05 % (p/v) de hidróxido de sodio (98%) de Sigma-Aldrich.

La fase móvil utilizada para las separaciones AEC fue una solución 30 mM de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (99%) (JT. Baker, Phillipsburg, N.J., EE. UU.). Esta se preparó diariamente y su pH se ajustó a 6 con ácido acético (99% (v/v)) (JT. Baker).

Soluciones de 25 y 250 mM de acetato de amonio ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ) de JT. Baker también fueron utilizadas como fase móvil para AEC.

La fase móvil utilizada para el fraccionamiento de proteínas por SEC fue una solución 50 mM de tris (trisaminometano,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) (98.8%) adquirido de J.T. Baker. Esta solución también se preparó diariamente y su pH se ajustó a 7,3 con ácido acético (99%) (JT.Baker).

Previamente al estudio de distribución de pesos moleculares, la columna SEC fue calibrada inyectando en el equipo de HPLC una mezcla patrón de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de vitamina B<sub>12</sub>: (1,3 kDa), citocromo C: (12 kDa), anhidrasa carbónica: (29 kDa) y albúmina: (66 kDa) (Sigma-Aldrich St Louis, EE. UU.)

La enzima proteasa XIV (Sigma-Aldrich) se utilizó para la hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en la matriz de las muestras de ajo.

Una solución de 0,5% (p/v) de yoduro de potasio (KI) (Sigma-Aldrich) se empleó como agente reductor durante la foto-oxidación UV de las especies de Se. La misma fue preparada en 0,2% (p/v) de hidróxido de sodio (98%) de Sigma-Aldrich.

Acetonitrilo de calidad LC-MS (Baker, EE. UU.) se empleó en las determinaciones por HPLC-ESI-MS/MS.

Las muestras fueron suspendidas en ácido fórmico (99% (v/v)) de Sigma-Aldrich al 2% (v/v) previamente al análisis por HPLC-ESI-MS/MS.

## **2.2- BIOFORTIFICACIÓN DE PLANTAS DE AJO CON Se**

### **2.2.1- ENSAYO A CAMPO**

Los ensayos de enriquecimiento de Se en ajo se realizaron en La Consulta, Estación Experimental, - INTA Mendoza, Argentina (33° 44' 00" S 69° 07' 00" W) durante la temporada de abril a diciembre de 2012. Estos ensayos se realizaron en condiciones de campo (Figura 2.2.1). Dos variedades clonales blancas (Nieve INTA y Unión FCA) y dos variedades clonales coloradas (Rubí INTA y Gostoso INTA) fueron estudiadas durante el transcurso de este ensayo. Estas variedades fueron fortificadas con una solución de Se ( $169 \text{ g Se L}^{-1}$ ) y con la aplicación en tres dosis: 0; 600 y  $1200 \text{ g Se ha}^{-1}$ , con un diseño de parcela al azar y tres repeticiones. El Se fue incorporado mediante 3 aplicaciones foliares de 0, 200 y  $400 \text{ g Se ha}^{-1}$  entre los meses de agosto-octubre del 2012 debido a que en dichos meses la planta se encuentra en la etapa de crecimiento vegetativo y por lo tanto, es capaz de asimilar y metabolizar los nutrientes de manera más eficiente (Burba, 2013). Durante diciembre de 2012 los ajos fueron cosechados y secados en caballete hasta humedad comercial (Aprox. 37%). Este secado se realiza para la conservación de los bulbos como se explicó en la sección 1.2.2. Posteriormente se realizó el muestreo de cada tratamiento. El órgano de estudio en este ensayo fue sólo el bulbo debido principalmente a que es la parte comestible de la planta de ajo.



**Figura 2.2.1: Ensayo a campo realizado durante la campaña 2012.**

## **2.2.2-ENSAYOS EN MACETAS**

### *2.2.2.1- Ensayos en macetas 2014*

Los ensayos de enriquecimiento de Se en ajo se realizaron en La Consulta, Estación Experimental, - INTA Mendoza, Argentina ( $33^{\circ} 44' 00''$  S  $69^{\circ} 07' 00''$  W) durante la temporada de abril a diciembre de 2014 (Figura 2.2.2). Los estudios iniciales del cultivo de ajos en maceta fueron realizados con la variedad de ajo Rubí INTA, el cual se fortificó con una solución de Se ( $169 \text{ g Se L}^{-1}$ ). Se aplicaron cuatro dosis: 0, 5, 10 y  $15 \text{ kg Se ha}^{-1}$ , con un diseño de parcela al azar y tres repeticiones. Durante el transcurso de este ensayo se realizaron tres muestreos, al inicio (septiembre de 2014), mediados (octubre de 2014) y al final (diciembre de 2014) del desarrollo. La plantación se realizó en macetas de 10 L, y como sustrato se empleó una mezcla de 90% de turba y 10% de suelo. Previo a la aplicación del Se, el sustrato fue analizado para descartar la presencia de este elemento, obteniendo concentraciones menores que el límite de detección (LOD), el cual es  $0,32 \mu\text{g Se L}^{-1}$  para la técnica utilizada que en este caso fue HG-AFS. La dosis de Se se aplicó por única vez en agosto de 2014 dado que la planta se encuentra en la etapa de crecimiento vegetativo y por lo tanto, es capaz de asimilar y metabolizar los

nutrientes de manera más eficiente como se explicó en la sección anterior. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas con una solución fertilizante 10: 1: 10 (N: P: K) alcanzando el equivalente a 300 kg N ha<sup>-1</sup>, 30 kg P ha<sup>-1</sup> y 300 kg K ha<sup>-1</sup> durante todo el ciclo. Los órganos estudiados en este ensayo fueron hoja, bulbo y raíz, los cuales fueron separados después de cada muestreo.



**Figura 2.2.2: Ensayo realizado en macetas durante la campaña 2014.**

#### 2.2.2.2-Ensayos en macetas 2015

Este ensayo también se realizó en La Consulta, Estación Experimental, - INTA Mendoza, Argentina (33° 44' 00" S 69° 07' 00" W) durante la temporada de abril a diciembre de 2015. Dos variedades clonales blancas (Nieve INTA y Unión FCA) y dos variedades clonales coloradas (Rubí INTA y Gostoso INTA) fueron estudiadas durante el transcurso de este ensayo. Estas variedades se fortificaron con una solución de Se (169 g Se L<sup>-1</sup>). Se aplicaron cuatro dosis: 0, 15, 30 y 45 kg Se ha<sup>-1</sup>, con un diseño de parcela al azar y tres repeticiones. La plantación se realizó en macetas de 10 L, y como sustrato se

empleó una mezcla de 90% turba y 10% de suelo. La dosis de Se se aplicó por única vez en agosto de 2015. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas con una solución fertilizante de 10: 1: 10 (N: P: K) alcanzando el equivalente a 300 kg N ha<sup>-1</sup> 30 kg P ha<sup>-1</sup> y 300 kg K ha<sup>-1</sup> durante todo el ciclo. Al final del desarrollo de la planta (diciembre de 2015) se realizó un único muestreo. Los órganos muestreados fueron hoja, bulbo y raíz de cada tratamiento y cada variedad. Los cuales fueron separados después de cada muestreo.

#### 2.2.2.3-Ensayo en macetas 2016

Este ensayo se realizó, como los anteriores, en La Consulta, Estación Experimental, - INTA Mendoza, Argentina (33 ° 44'00 "S 69 ° 07'00" W) durante la temporada de abril a diciembre de 2016. En este caso, para el estudio se trabajó con la variedad Nieve INTA y se fortificó con una solución de Se (169 g Se L<sup>-1</sup>). Se aplicaron cuatro dosis: 0, 5, 10 y 15 kg Se ha<sup>-1</sup>, con un diseño de parcela al azar y tres repeticiones. Durante el transcurso de este ensayo se realizaron tres muestreos, al inicio (septiembre de 2016), mediados (octubre de 2016) y al final (diciembre de 2016) del desarrollo. La plantación se realizó en macetas de 10 L, y como sustrato se empleó una mezcla de 90% turba y 10% de suelo. La dosis de Se se aplicó por única vez en agosto de 2016. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas con una solución fertilizante de 10: 1: 10 (N: P: K) alcanzando el equivalente a 300 kg N ha<sup>-1</sup> 30 kg P ha<sup>-1</sup> y 300 kg K ha<sup>-1</sup> durante todo el ciclo. Los órganos estudiados en este ensayo fueron hoja, bulbo y raíz. Los cuales fueron separados después de cada muestreo.

## **2.3-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **2.3.1-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS LUEGO DEL MUESTREO**

Después de cada muestreo los órganos de cada planta (hoja, bulbo y raíz) se limpiaron, pesaron, liofilizaron y homogenizaron. Finalmente fueron almacenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Para la liofilización y homogeneización se utilizó un liofilizador Modelo 6 (Virtis, Nueva York, EE. UU.) con una capacidad de 12 L y un molino modelo MO- 8100A (Ultracomb, Buenos Aires, Argentina), respectivamente.

### **2.3.2-DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SÓLIDOS**

Para la determinación del porcentaje de sólidos las muestras fueron pesadas antes y después de ser liofilizadas y se calculó por diferencia el porcentaje de humedad y de sólidos en cada muestra.

### **2.3.3- DIGESTIÓN**

Para la determinación de Se total en los diferentes órganos de ajo se realizó una digestión ácida. Básicamente, 1,0 g de muestra seca (liofilizada) se puso en contacto con 10 mL de  $\text{HNO}_3$  (65% (p/p)) y 2 mL de  $\text{HCl}$  (37% (p/p)). La mezcla se dejó reposar durante 12 horas y luego se sometió a un calentamiento escalonado (1 h a  $50^{\circ}\text{C}$ ; 1,5 h a  $100^{\circ}\text{C}$ ; 1,5 h a  $150^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, el Se(VI) presente en cada muestra se redujo a Se(IV) mediante la adición de 3 mL de  $\text{HCl}$  6 M y la mezcla se llevó a ebullición durante 7 min. Finalmente, la muestra se filtró, diluyó a 50 mL en un matraz volumétrico y almacenó hasta el momento de la determinación.

Para la determinación de Mg, Zn, Mn, Cu, Fe, P y S se realizó una digestión ácida en microondas. Aproximadamente 0,150 g de muestra seca fueron digeridos con 6 mL de 65% (p/p) de  $\text{HNO}_3$  y 0,5 mL de 30% (p/p) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La descomposición de la muestra se realizó en un horno de microondas (DGT, Provector Analítica, Jundiaí, Brasil) a una

potencia nominal de 1200 W. El programa de descomposición consistió de cuatro pasos: 1) 5 minutos a 400 W, 2) 8 minutos a 790 W, 3) 4 min a 320 W, y 4) 3 min a 0 W. Finalmente, la muestra se filtró y diluyó a 50 mL.

#### **2.3.4-EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Antes de la separación de proteínas por SEC, las mismas se extrajeron poniendo en contacto 0,2 g de cada muestra con 3 mL de NaOH 0,05 M durante 1 h con agitación magnética constante. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (3500 rpm) durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de poli-éter-sulfona (0,22  $\mu\text{m}$ ).

La centrífuga marca Luguimac S.R.L. (Luguimac, Buenos Aires, Argentina), modelo LC 15, de revolución variable, fue empleada para centrifugación de las muestras y la separación de los extractos de los residuos sólidos. La agitación de las muestras se realizó con un agitador tipo vórtex marca Boeco (Hamburgo, Alemania) y modelo Bio Vortex V1.

#### **2.3.5-EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA**

Para la determinación de Se(IV), Se(VI) y Se-aminoácidos se realizó una hidrólisis enzimática de las muestras con el objeto de liberar el Se desde las proteínas presentes en las matrices de las diferentes muestras (hoja, bulbo y raíz). Las especies de Se fueron extraídas poniendo en contacto 0,2 g de muestra seca con 5 mL de solución tampón Tris (0,05 M, pH 7,5) y 0,02 g de Proteasa XIV. La solución se mantuvo a temperatura constante de 50 °C y agitación con barra magnética durante 24 h. La mezcla final se centrifugó (3500 rpm) y filtró con un filtro de celulosa regenerada de 0,22  $\mu\text{m}$ .

La centrífuga marca Luguimac S.R.L y el agitador tipo vórtex marca Boeco también se emplearon para la agitación y centrifugación de las muestras.

## 2.4-MÉTODOS TRADICIONALES DE COCCIÓN

Para evaluar el efecto de diferentes métodos tradicionales de cocción sobre el contenido y especiación de Se, parte de los ajos obtenidos según lo indicado en la sección 2.2.2.1 se secaron en caballete hasta una humedad comercial del 37%. Los bulbos que son la parte comestible de la planta se aislaron de las hojas y raíces. Posteriormente, fueron pelados y picados, y finalmente cinco tratamientos térmicos de cocción tradicionales se aplicaron de la siguiente manera:

2.4.1- Horno convencional: Un horno de convección (Philco HEE-PH65, Argentina) fue precalentado a 180 ° C. Seguidamente 3 g de ajo fresco se colocaron sobre un plato y fueron calentados durante 10 minutos en el horno de convección. Después de hornear, la muestra se enfrió hasta temperatura ambiente.

2.4.2. Cocción en agua en ebullición: 3 g de ajo fresco se sumergió en 500 mL de agua hirviendo durante 10 min. Luego, la muestra se escurrió y se enfrió hasta temperatura ambiente. El Se en el agua de canilla utiliza no fue detectable (LOD=0,32  $\mu\text{g Se L}^{-1}$ )

2.4.3-Microondas: La muestra de ajo fresco (3 g) se calentó en un horno microondas Whirlpool JQ278BL (Buenos Aires, Argentina) durante 3 minutos a 800 W. Después, la muestra se enfrió hasta temperatura ambiente.

2.4.4- Cocción con vapor: Aproximadamente 600 mL de agua de canilla fueron llevados hasta ebullición en una vaporera de Smart Tek modelo SD2071 (Smart Tek, Buenos Aires, Argentina) y 3 g de ajo fresco se cocinaron al vapor durante 10 min. Entonces, la muestra fue enfriada hasta temperatura ambiente. El Se no se detectó en el agua utilizada (LOD=0,32  $\mu\text{g Se L}^{-1}$ ).

2.4.5-Cocción en aceite a 180°C: Se añadió aceite de girasol (50 g) a una sartén y se calentó hasta que el aceite alcanzó la temperatura de 180 ° C. Una pequeña bolsa de tela se llenó con 3 g de ajo fresco y se sumergió en el aceite de girasol caliente durante 3 min. Después, la muestra se escurrió y enfrió hasta temperatura ambiente.

Finalmente, al cabo de cada tratamiento térmico, las muestras fueron liofilizadas, homogenizadas y almacenadas a -18 °C para su posterior análisis.

Para la liofilización y homogeneización se utilizaron un liofilizador Modelo 6 (Virtis, Nueva York, EE. UU.) con una capacidad de 12 L y un molino modelo MO-8100A (Ultracomb, Buenos Aires, Argentina), respectivamente.

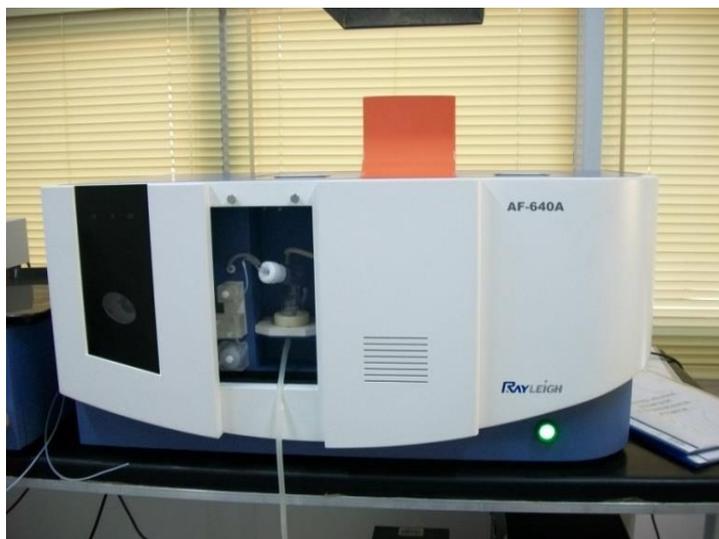
## **2.5- DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **2.5.1-DETERMINACIÓN DE Se TOTAL POR HG-AFS**

La técnica de generación de hidruros acoplada a la espectrometría de fluorescencia atómica (HG-AFS) es una herramienta muy utilizada para la determinación de Se debido a su elevada sensibilidad y selectividad (Cai, 2000). El equipo de HG-AFS para la determinación de Se consiste principalmente en dos partes, el generador de hidruros y el detector AFS (Cai, 2000). En la primera parte el Se forma hidruros covalentes bajo condiciones ácidas (Raman, Shanti; Hodes, 2012). Debido a que la única especie de Se que puede producir hidruros es Se(IV), se debe realizar una reducción del Se a los efectos de asegurar que el elemento se encuentre en el estado de oxidación apropiado. (Raman, Shanti; Hodes, 2012).

Una vez que el hidruro de Se correspondiente ha sido formado por reacción entre Se(IV) y NaBH<sub>4</sub>, el cual es utilizado como reductor, el hidruro es transportado hacia el atomizador por acción de un gas inerte que normalmente es el argón. En el atomizador el hidruro se descompone en una llama de aire-hidrógeno y los átomos libres generados son

excitados por efecto de una radiación electromagnética proveniente de una fuente de emisión (lámpara), luego de lo cual los átomos excitados liberan su energía a través de emisión de radiación electromagnética de longitud de onda característica del elemento medido. En el caso de HG-AFS se mide la emisión de fluorescencia generada por los átomos de Se libres, siendo la intensidad de emisión proporcional a la concentración del elemento en las soluciones (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008). De esta manera, en el presente trabajo de tesis doctoral, las determinaciones de Se total de cada uno de los ensayos se realizó mediante HG-AFS. Un espectrómetro de fluorescencia atómica modelo AF-640A de Rayleigh (Rayleigh, Beijing, China) fue utilizado para tal fin (Figura 2.5.1), equipado con una lámpara de cátodo hueco de alta intensidad (HCL) (Rayleigh) que se usó como fuente de luz. Las condiciones instrumentales se listan en la Tabla 2.5.1.



**Figura 2.5.1: Espectrómetro de fluorescencia atómica modelo AF-640A de Rayleigh.**

**Tabla 2.5.1:** Condiciones instrumentales utilizadas en el equipo de HG-AFS.

Voltaje PMT	270 V
Longitud de onda	196 nm
Corriente	40 mA
Flujo de argón	800 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura de atomización	300 °C
Modo de atomización	Llama
Tiempo de lectura	20 s
Retardo	1 s
Volumen inyectado	12 mL min <sup>-1</sup>
Tiempo de muestreo	8 s
Conc. NaBH <sub>4</sub>	0,7% (p/v) in 0,05% (p/v) NaOH
Conc. HCl carrier	5% (v/v)

### 2.5.2-DETERMINACIÓN DE Cu, Fe, Mg, Mn, P, S, Zn POR ICP-MS

La concentración de diferentes elementos (Mg, Zn, Mn, Cu, Fe, P y S) en las muestras de ajo se determinó mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Un análisis por espectrometría de masas atómica implica las siguientes etapas: (1) atomización, (2) conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones (generalmente iones positivos de una sola carga), (3) separación de los iones formados en la segunda etapa según su relación masa/carga ( $m/z$ ), donde  $m$  es la masa del ion y  $z$  es su carga, y (4) recuento del número de iones de cada tipo o medida de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en un detector adecuado (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008).

Dado que la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga, la relación  $m/z$  habitualmente coincide directamente con la masa del ion. Las primeras dos etapas se llevan a cabo luego de la introducción de la muestra en un atomizador (en este caso un plasma acoplado inductivamente) con la ayuda de un sistema de nebulización (para muestras líquidas). Finalmente, las etapas 3 y 4 se llevan a cabo en el interior de un espectrómetro de masas sometido a alto vacío para permitir el transporte de los iones previamente formados.

El espectrómetro de masas modelo Elan DRC-e ICP-MS de Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA) se usó en la determinación de estos elementos (Figura 2.5.2). Los parámetros instrumentales se enumeran en la Tabla 2.5.2. Dependiendo del analito, se adoptaron diferentes estrategias para la eliminación de las interferencias, incluidos dos gases de reacción diferentes: oxígeno y metano. La calibración instrumental se realizó mediante los métodos de calibración externa o el agregado patrón en casos necesarios, incorporándose a todas las soluciones  $^{103}\text{Rh}$  que se empleó como patrón interno y a los efectos de realizar correcciones de cualquier inestabilidad instrumental durante el tiempo de lectura. Dichas prácticas de calibración son comunes cuando se trabaja con ICP-MS.



**Figura 2.5.2:** Espectrómetro de masas modelo Elan DRC-e ICP-MS de Perkin Elmer.

**Tabla 2.5.2:** Condiciones instrumentales del equipo de ICP-MS.

<i>Condiciones instrumentales de ICP-MS</i>					
Cámara de pulverización	Ciclónica				
Nebulizador	Meinhard®				
Potencia	1200 W				
Flujo de gas	15 L min <sup>-1</sup>				
Flujo de gas carrier	0,74 L min <sup>-1</sup>				
Flujo de gas auxiliar	1,00 L min <sup>-1</sup>				
Tiempo de residencia	60 ns				
Isotopos monitoreados	<sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>24</sup> Mg, <sup>55</sup> Mn, <sup>54</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>47</sup> PO, <sup>48</sup> SO, <sup>103</sup> Rh (standard interno)				
<i>Condiciones instrumentales de la celda de reacción</i>					
<i>Elemento</i>	<i>Isótopo determinado</i>	<i>Gas de reacción</i>	<i>Flujo de gas (L min<sup>-1</sup>)</i>	<i>RPq (V)</i>	<i>RPa (V)</i>
Fe	<sup>54</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe	Metano	1,20	0,75	0,00
Cu	<sup>63</sup> Cu	Metano	0,70	0,70	0,00
Mn	<sup>55</sup> Mn	Metano	0,70	0,70	0,00
P	<sup>47</sup> PO	Oxigeno	0,750	0,40	0,01
S	<sup>48</sup> SO	Oxigeno	0,750	0,40	0,00

### 2.5.3- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE Se POR HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que opera bajo diferentes principios (exclusión de tamaño, intercambio iónico y fase reversa), brinda la posibilidad de separar especies no volátiles de Se y otros elementos para identificación de estas por comparación de tiempos de retención con patrones mezcla de especies conocidas. Esta

técnica puede acoplarse directamente a diferentes detectores, tales como ICP-MS o AFS, los cuales permiten la detección específica del elemento, en este caso el Se. Para el trabajo de tesis doctoral, el análisis de especiación de Se se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o cromatografía de intercambio aniónico (AEC), dependiendo esto del tipo de información buscada, es decir, SEC para fraccionamiento de proteínas y AEC para la separación de especies inorgánicas de Se y Se-aminoácidos.

#### 2.5.3.1-Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

En la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), el tiempo de residencia en los poros depende del tamaño de las moléculas de los analitos (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008). Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de poros del relleno son excluidas y de esta forma no se retienen y, por lo tanto, son las primeras eluidas desde la columna (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008). Las moléculas que tienen diámetros significativamente menores que los poros, pueden penetrar hacia el interior de estos y así resultan atrapadas durante más tiempo, lo cual lleva a tiempo de retención más elevados (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008).

En el caso de la presente tesis doctoral, SEC se eligió para investigar las asociaciones de Se a fracciones de proteínas solubles en los extractos alcalinos realizados sobre las muestras. Para ello se acopló el equipo de HPLC a detectores UV e ICP-MS. Para tal fin una columna BioSep-SEC-S-2000 adquirida de Phenomenex (Phenomenex, Torrance, EE. UU.) fue utilizada. Las muestras fueron inyectadas en un sistema HPLC 200LC de Perkin Elmer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EE. UU.), compuesto por una bomba cuaternaria acoplada a un detector UV-vis y a un espectrómetro de masas modelo 350Q de Perkin Elmer. Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 2.5.3.

**Tabla 2.5.3:** Parámetros instrumentales de ICP-MS y HPLC.

<i>Condiciones instrumentales de ICP-MS</i>	
ICP-MS	350Q de PerkinElmer
Potencia	1250 W
Flujo de gas	16 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas auxiliar	1,20 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas carrier	0,87 L min <sup>-1</sup>
Tiempo de residencia	35 ns
Isótopos monitoreados	<sup>76</sup> Se, <sup>77</sup> Se, <sup>78</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>103</sup> Rh (standard interno)
<i>Parámetros cromatográficos de SEC</i>	
Columna	BIOSEP-SEC-S-2000
Fase móvil	0,05 M Tris buffer, pH 7,3
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Volumen inyectado	100 µL
Detección UV	280 nm
<i>Parámetros cromatográficos de AEC</i>	
Columna	Hamilton PRP X100A
Fase móvil	30 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> buffer, pH 6
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Volumen Inyectado	100 µL

### 2.5.3.2-Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)

El análisis de especiación de Se fue realizado a través de la identificación de las especies de acuerdo al tiempo de retención observado en AEC. En este tipo de técnica, las separaciones se fundamentan en retener aniones que interactúan con los grupos funcionales de la superficie de la fase estacionaria cargados positivamente (Douglas A. Skoog, F. James Holler, 2008). En este trabajo de tesis doctoral, el análisis cromatográfico se realizó con una columna PRP-X100 de Hamilton (Hamilton, Nevada, EE. UU.). Las muestras fueron también inyectadas en el sistema HPLC 200LC de Perkin Elmer acoplado a un espectrómetro de masas. En este caso se emplearon dos modelos de espectrómetros de masas, uno modelo 350Q de Perkin Elmer y otro modelo Elan DRC-e ICP-MS de Perkin Elmer. La posibilidad de disponer de dos equipos de ICP-MS se debió a que el acceso a esta técnica se realizó a través de la colaboración de dos grupos de investigación diferentes, uno el de la Dra. Patricia Smichowski de la Comisión Nacional de Energía Atómica y el otro el del Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda de la Universidad de Campiñas (San Pablo, Brasil). Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 2.5.3 y 2.5.4, respectivamente.

**Tabla 2.5.4:** Parámetros instrumentales de la técnica AEC-ICP-MS.

<i>Condiciones instrumentales de ICP-MS</i>	
ICP-MS	PerkinElmer ELAN DRC-e
Nebulizador	Meinhard
Cámara de pulverización	Ciclónica
Potencia	1050 W
Flujo de gas (nebulizador)	0,75 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas auxiliar	1,10 L min <sup>-1</sup>
Tiempo de residencia	60 ns
Flujo de gas O <sub>2</sub> en la celda	0,3 L min <sup>-1</sup>
RPq	0,6 V
Isótopos monitoreados	<sup>96</sup> SeO <sup>+</sup> , <sup>103</sup> Rh (standard interno)
<i>Condiciones cromatográficas de AEC</i>	
Columna	Hamilton PRP X100A
Fases móviles	A: Acetato de amonio (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ), 25 mM, pH=5,17 B: Acetato de amonio (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ), 250 mM, pH=5,17
Gradiente de elución	100% A (5 min), 75% A (2 min), 50% A (7 min), 0% A (10 min), 50% A (3 min), 100% A (3 min)
Flujo	1,0 mL
Volumen inyectado	100 µL

En particular cuando el análisis de especiación de Se se realizó por AEC-HG-AFS, se realizó con un sistema cromatográfico consistente en un desgasificador de vacío YL9101, una bomba cuaternaria YL9110 de suministro de disolvente (YL Instrument Co., Ltd., Seúl, Corea del Sur) y una válvula Rheodyne con un inyector de bucle de 100  $\mu\text{L}$  (Cotati, CA, EE.UU.). El mismo fue acoplado a un sistema de digestión Rayleigh PDI-10 UV (con interfase) (Beijing Rayleigh analítica Instrument Corp., Beijing, China) y al detector AFS Rayleigh AF-640A (Figura 2.5.3). Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 2.5.5.



**Figura 2.5.3:** Sistema cromatográfico a) bomba cuaternaria con un sistema desgasificador, b) PDI-UV (sistema de digestión) y c) espectrómetro de fluorescencia atómica (AFS).

**Tabla 2.5.5:** Parámetros instrumentales de AEC-HG-AFS.

<i>Condiciones instrumentales de HG-AFS</i>	
Voltaje PMT	270 V
Longitud de onda	196 nm
Corriente	40 mA
Flujo de argón	800 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura de atomización	400 °C
Modo de atomización	Llama
Conc. NaBH <sub>4</sub>	2,5% (p/v) en 0,05% (p/v) NaOH
Conc. HCl carrier	12% (v/v)
Flujo de NaBH <sub>4</sub> y HCl	6 mL min <sup>-1</sup>
Conc. KI (post columna tratamiento)	0,5% (p/v) en 0,2% (p/v) NaOH
Flujo de KI	1,5 mL min <sup>-1</sup>
<i>Parámetros cromatográficos de AEC</i>	
Columna	Hamilton PRP X100A
Fase móvil	30 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> buffer, pH 6
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Volumen Inyectado	100 µL

#### 2.5.4-IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE Se POR LC-ESI-MS/MS

La identificación de los compuestos de Se en las plantas de ajo se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a un analizador molecular, usando una fuente de ionización suave por electrospray (LC-ESI-MS/MS). El analizador molecular empleado fue del tipo cuadrupolo-tiempo-de vuelo (Q-TOF). Este es un sistema híbrido de espectrometría de masas, en el cual un analizador de cuadrupolo (Q) se utiliza en conjunto

con el analizador tiempo de vuelo (TOF). En este sistema, cuadrupolo se utiliza para seleccionar y guiar los iones, mientras que el sistema TOF se emplea para la detección simultánea de los iones a lo largo de todo el rango de relación  $m/z$  (Herbert and Johnstone, 2010). De esta manera, del registro de los espectros de fragmentación de las estructuras moleculares correspondientes a las diferentes especies de Se se pueden identificar sin usar estándares que en muchas ocasiones no están disponibles comercialmente (Ruszczyńska et al., 2017).

Por lo que para obtener los espectros de masas de los compuestos de Se se procedió de la siguiente manera: los picos obtenidos por AEC fueron colectados 20 veces y se concentraron en una centrífuga de vacío hasta sequedad. Seguidamente fueron suspendido en ácido fórmico acuoso al 2% (v/v) en un volumen final de 23  $\mu\text{L}$ . Las muestras así preparadas se inyectaron directamente en un equipo LC-QTOF modelo G6560A para su caracterización. Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 2.5.6.

**Tabla 2.5.6:** Condiciones instrumentales utilizadas en LC-ESI-MS/MS.

<i>Condiciones instrumentales de LC</i>	
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8 (4,6 $\times$ 150 mm, partículas de 3,5 $\mu\text{m}$ )
Temperatura de la columna	40°C
Volumen inyectado	20 $\mu\text{L}$
Fase móvil	A=agua, B= acetonitrilo
Gradiente	5% de B por 2 min, de 5% a 95% de B por 5 min, de 95% a 5% de B por 3 min.
Flujo	0,3 mL min <sup>-1</sup>
<i>Condiciones instrumentales de Q-TOF-MS</i>	
Modo ion	ESI, ion positivo

Gas (nebulizador)	45 psi
Voltaje capilar	5,0 kV
Poder de resolución	50 a 1500 m/z

---

## 2.6-FACTOR DE TRANSLOCACIÓN (FT)

El factor de translocación (FT) fue calculado como la relación entre la concentración de Se en las hojas y la concentración de Se en las raíces (Renkema et al., 2012). Y fue utilizado para evaluar la capacidad de las plantas de ajo de transportar y acumular Se durante su desarrollo.

$$FT = \frac{[Se]_{hojas}}{[Se]_{raíces}}$$

## 2.7-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5% utilizando InfoStat / L.

## 2.8-BIBLIOGRAFÍA

Burba, J.L., 2013. 100 Temas Sobre La Producción De Ajo, INTA. ed.

Cai, Y., 2000. Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry. *Trac-Trends Anal. Chem.* 19, 62–66.

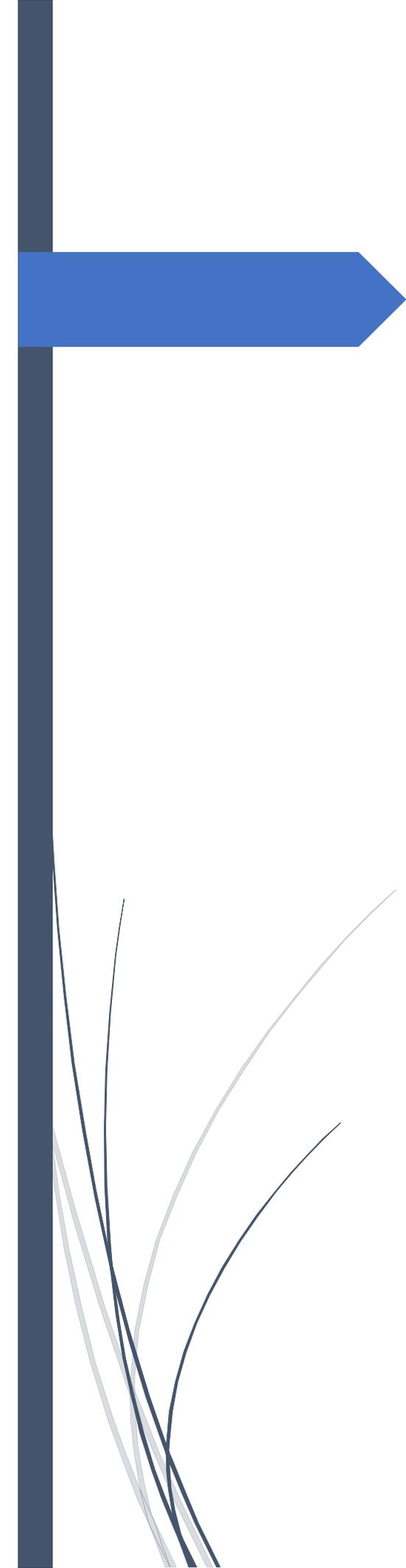
Douglas A. Skoog, F. James Holler, S.R.C., 2008. Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill Interamericana de España, p. 1011.

Herbert, C.G., Johnstone, R. a. W., 2010. *Mass Spectrometry Basics*.

Raman, Shanti; Hodes, D., 2012. *PS Analytical - User Manual*.

Renkema, H., Koopmans, A., Kersbergen, L., Kikkert, J., Hale, B., Berkelaar, E., 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant Soil* 354, 239–250.

Ruszczyńska, A., Konopka, A., Kurek, E., Torres Elguera, J.C., Bulska, E., 2017. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 130, 7–16.



# **Capítulo 3: Resultados y Discusión**

### 3.1- ESTUDIOS DE ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN DE Se EN DIFERENTES VARIETADES CLONALES DE AJO ARGENTINO CULTIVADAS EN CONDICIONES DE CAMPO

El Se es un elemento traza esencial para animales y humanos dado que forma parte de enzimas como la glutatión peroxidasa (Kieliszek and Błażej, 2013) y además presenta propiedades antioxidantes y anticancerígenas. De hecho, numerosos estudios han demostrado que una dieta suplementada con Se reduce la incidencia de cáncer en humanos (De Martino et al., 2006). El consumo diario de Se debe ser  $50 \mu\text{g día}^{-1}$  (Tapiero et al., 2003).

Debido a su importancia para la salud, en los últimos años se ha producido un incremento significativo en el consumo de suplementos dietarios a base de Se. El ajo es conocido por sus efectos beneficiosos (anticoagulante, vasodilatador, reductor de grasa y colesterol, germicida, antiinflamatorio y anticancerígeno) por lo que se lo puede considerar un alimento funcional (Burba, 2013). Además es una de las especies que mayor cantidad de Se puede acumular, alrededor de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  (Arnault and Auger, 2006) por lo que puede ser una atractiva opción de alimento enriquecido con dicho elemento, pudiendo ser utilizado como suplemento natural en la dieta. Sin embargo, no existen estudios diferenciales sobre la acumulación de Se en diferentes variedades clonales para evaluar la eficiencia de estas en la biofortificación con Se.

Por lo que en la presente sección se evaluó la acumulación de Se en cuatro clones de ajo argentino (Nieve INTA, Unión FCA, Gostoso INTA y Rubí INTA) fortificados con Se bajo condiciones experimentales de campo. El Se se aplicó en forma foliar y los ensayos se realizaron como se indicó en la sección 2.2.1.

En las cuatro variedades clonales se evaluó el efecto y acumulación de Se, así como también la especiación de dicho elemento, para evaluar su aptitud para biofortificación y los resultados se exponen a continuación.

### **3.1.1-EFECTO DE LA BIOFORTIFICACIÓN DE Se SOBRE EL RENDIMIENTO DE LOS BULBOS**

El rendimiento del cultivo es un parámetro importante que debe ser evaluado ya que los beneficios generados por el cultivo se basan en la cantidad de ajo producido. Por lo tanto, los rendimientos total y comercial se evaluaron en las cuatro variedades clonales ensayadas para determinar su tolerancia a diferentes dosis de Se aplicadas, en forma foliar. El rendimiento total se calculó sobre el peso de bulbos limpios y secos (humedad comercial del 37%) producidos por hectárea. Mientras que el rendimiento comercial se calculó sobre el peso de los bulbos que no presentaban deformaciones y que superaron el calibre 4. Los resultados se detallan en las Tablas 3.1.1 y 3.1.2. Se puede observar que no hubo diferencias significativas tanto en el rendimiento total como en el comercial de las variedades tratadas con diferentes dosis de Se. Por lo que el ajo demuestra ser resistente a las dosis de Se aplicadas por lo que podría ser una opción para suplementar Se en la dieta humana sin disminuir su rendimiento.

Resultados similares fueron reportados en achicoria y otras plantas silvestres donde las plantas no mostraron ningún síntoma de toxicidad debida a la aplicación foliar de diferentes dosis de Se como así también el rendimiento de estas no se vio significativamente afectado (Drahoňovský et al., 2016; Germ et al., 2007). También fue reportado que en plantas como el arroz y la albaca la aplicación foliar de Se aumentó el rendimiento de los plantas y su poder antioxidante (Boldrin et al., 2013; Hawrylak-Nowak, 2008; Xu and Hu, 2004).

**Tabla 3.1.1:** Efecto de la bifortificación de Se sobre el rendimiento total de los bulbos expresado en Mg ha<sup>-1</sup> ( 1 Mg= 10<sup>6</sup> g).

Tratamiento (g Se ha <sup>-1</sup> )	<i>Rendimiento total (Mg ha<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></i>			
	Ru	Go	Ni	Un
0	9,8	9,1	14,6	13,9
600	9,4	9,7	13,9	14,7
1200	10,5	9,3	15,0	13,7
DMS	0,9	2,1	2,6	5,4
CV	3,2	7,6	6,2	13,2
Significancia	*	NSig.	NSig.	NSig.

<sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas. Ru: Rubí INTA; Go: Gostoso INTA; Ni: Nieve INTA; Un: Unión FCA; DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación; s: significativo; NSig.: no significativo.

**Tabla 3.1.2:** Efecto de la bifortificación de Se sobre el rendimiento comercial de los bulbos expresado en Mg ha<sup>-1</sup> ( 1 Mg= 10<sup>6</sup> g)..

Tratamiento (g Se ha <sup>-1</sup> )	<i>Rendimiento comercial (Mg ha<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></i>			
	Ru	Go	Ni	Un
0	10,1	10,3	15,2	14,0
600	10,0	11,5	14,2	14,4
1200	11,2	10,3	15,3	13,6
DMS	2,5	2,9	3,2	5,5
CV	8,2	9,3	7,5	13,5
Significancia	NSig	NSig.	NSig.	NSig.

<sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas. Ru: Rubí INTA; Go: Gostoso INTA; Ni: Nieve INTA; Un: Unión FCA; DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación; s: significativo; NSig.: no significativo.

Sin embargo, en papas fue reportado que dosis elevadas de Se aplicadas por vía foliar disminuyeron el rendimiento debido a que el Se afectó la síntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales generando toxicidad en las plantas (Ježek et al., 2011). Por lo

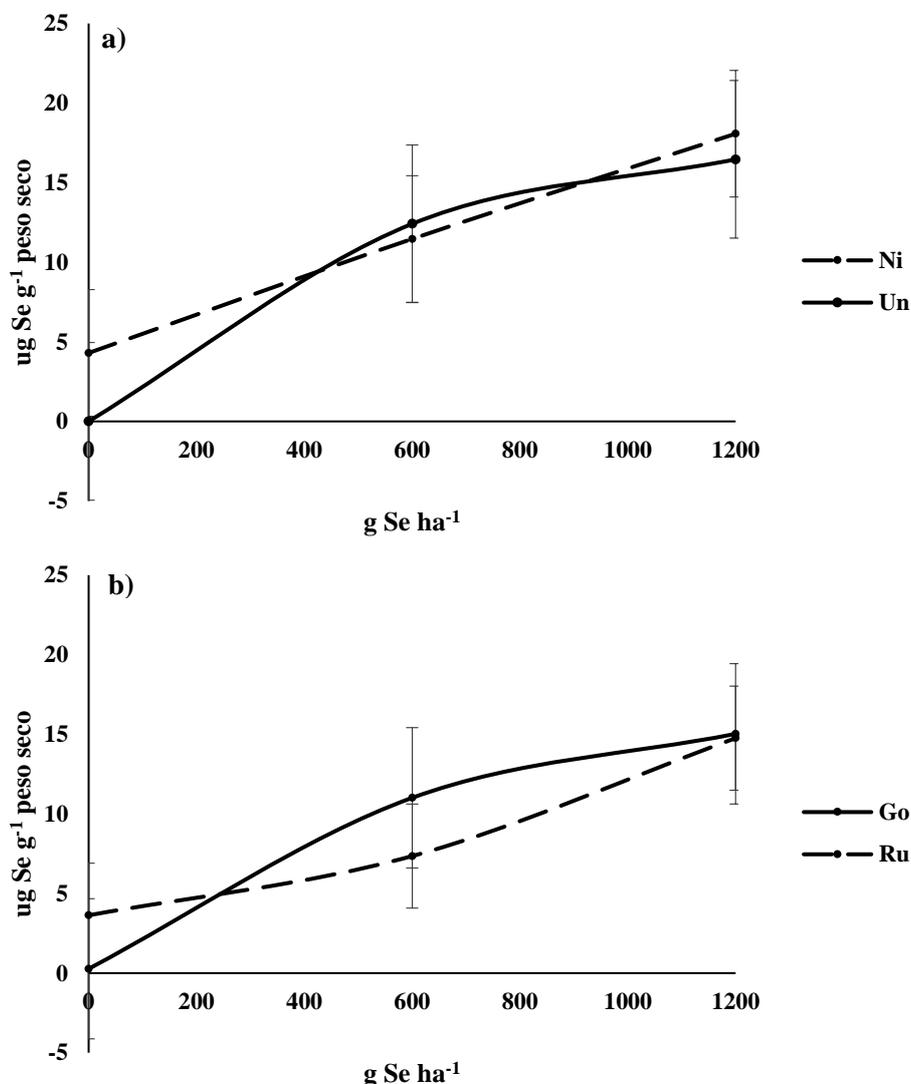
que la dosis a aplicar es un parámetro importante que considerar para no disminuir el rendimiento de las plantas.

### 3.1.2-ACUMULACIÓN DE Se EN DIFERENTES VARIEDADES CLONALES

El Se total se determinó mediante la técnica de HG-AFS después de la digestión ácida de las muestras de bulbos obtenidos durante la campaña 2012. Previamente, se realizó un estudio de recuperación mediante la adición de una cantidad conocida de Se a las muestras, antes del procedimiento de digestión. Los valores de recuperación fueron calculados usando la siguiente ecuación:  $100 \times [(C_{Se, final} - C_{Se, inicial}) / C_{Se, adicionada}]$ ; donde  $C_{Se, final}$  representa la concentración de Se hallada en las muestras después de la adición de  $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ ,  $C_{Se, inicial}$  fue la concentración de Se en las muestras y  $C_{Se, adicionada}$  corresponden al nivel de concentración de Se adicionado ( $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ ). Se realizaron determinaciones por triplicado en cada caso. Las recuperaciones analíticas obtenidas estaban en el rango de 97,2 a 102%. Además, la precisión del método fue ensayado mediante el análisis de un material de referencia certificado (CRM), BCR 402 trébol blanco de Sigma-Aldrich, con un valor certificado de  $6,70 \pm 0,25 \text{ mg Se kg}^{-1}$ . Por lo que, usando esta metodología, la concentración de Se encontrada en el CRM fue de  $6,58 \pm 0,010 \text{ mg Se kg}^{-1}$  ( $n = 6$  y 95% intervalo de confianza) y no se observaron diferencias significativas con el valor certificado, lo que indica una precisión aceptable del método ( $p < 0,01$ ).

La concentración de Se en dos variedades blancas (Nieve INTA y Unión FCA) y en dos variedades coloradas (Rubí INTA y Gostoso INTA) según la dosis de Se aplicada se muestra en la Figura 3.1.1. Se puede observar que existe una acumulación de Se diferencial y significativa entre los bulbos testigos y aquellos que fueron tratados. Por lo que el ajo podría contribuir a aumentar la ingesta de Se en la dieta humana. No se

observaron diferencias significativas en el Se acumulado por las variedades clonales. De esta manera, puede asegurarse que el Se acumulado depende de la dosis aplicada.



**Figura 3.1.1: Concentración de Se en bulbos de variedades clonales biofortificadas con diferentes dosis de Se.** a) Concentración de Se en variedades blancas y b) Concentración de Se en variedades coloradas. Ni: Nieve INTA, Un: Unión FCA, Go: Gostoso INTA, Ru: Rubí INTA.

Estos resultados concuerdan con los reportados en achicoria, donde la concentración de Se en las plantas tratadas fue el doble que en las plantas control (Germ et al., 2007). En plantas como el arroz, el nabo y la zanahoria, la aplicación foliar de Se

también dio lugar al aumento del contenido de Se en dichas plantas (Boldrin et al., 2013; Kápolna et al., 2009; Li et al., 2018).

Por otro lado, la acumulación de Se depende también de la forma en que este elemento es aplicado, siendo el Se(VI) la especie que está más biodisponible para las plantas debido a su fácil movilidad a través del floema cuando se aplica a las hojas, como a través del xilema cuando se aplica a través de las raíces (Boldrin et al., 2013; Poggi et al., 2000).

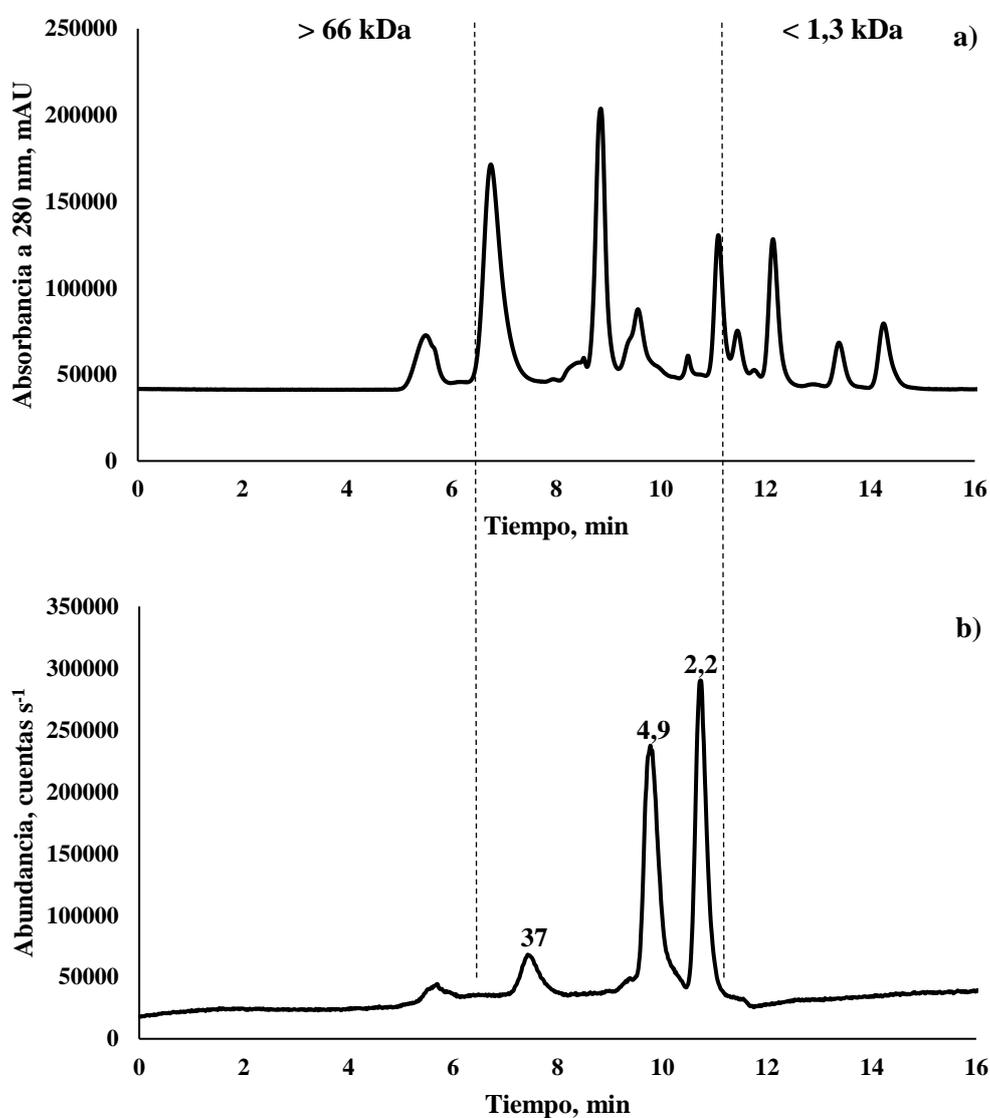
Por lo tanto, el tratamiento con Se(VI) es una buena opción para aumentar el contenido de Se en ajo por dos razones, por su alta biodisponibilidad para las plantas y además por el bajo precio del  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en comparación con el precio de compuestos orgánicos de Se, tales como Se-aminoácidos u otros compuestos. Consecuentemente, el uso de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  como fuente de Se representa una excelente estrategia para la biofortificación de cultivos a gran escala.

### 3.1.3-EVALUACIÓN DE LOS PERFILES PROTEICOS ASOCIADOS CON Se

La asociación química de Se a fracciones de diferentes pesos moleculares en muestras de ajo de distintas variedades clonales fueron estudiadas mediante las técnicas HPLC-UV y HPLC-ICP-MS (Fig. 3.1.2, a y b).

Previo al análisis de las muestras, la columna SEC fue calibrada, usando una mezcla estándar de vitamina B12 (1,3 kDa), citocromo C (12 kDa), anhidrasa carbónica: (29 kDa) y albúmina (66 kDa) (Sigma-Aldrich St Louis, EE. UU.) obteniéndose una respuesta lineal del logaritmo del peso molecular frente al tiempo de retención ( $r^2 = 0.9668$ ). La detección de estos estándares de calibración se realizó por UV a 280 nm. Como fase móvil se empleó una solución tampón 50 mM de Tris a pH 7,3, lo que llevó a obtener una buena resolución con tiempos de retención cortos. Además, esta solución

tampón evitó la precipitación de proteínas dentro de la columna e interacciones hidrofóbicas de estos compuestos con la fase estacionaria, lo cual de otro modo habría afectado las separaciones SEC.



**Figura 3.1.2: Cromatogramas de exclusión de tamaño que muestran la asociación de Se a diferentes fracciones de peso molecular en ajo. a) SEC-UV y b) SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ )**

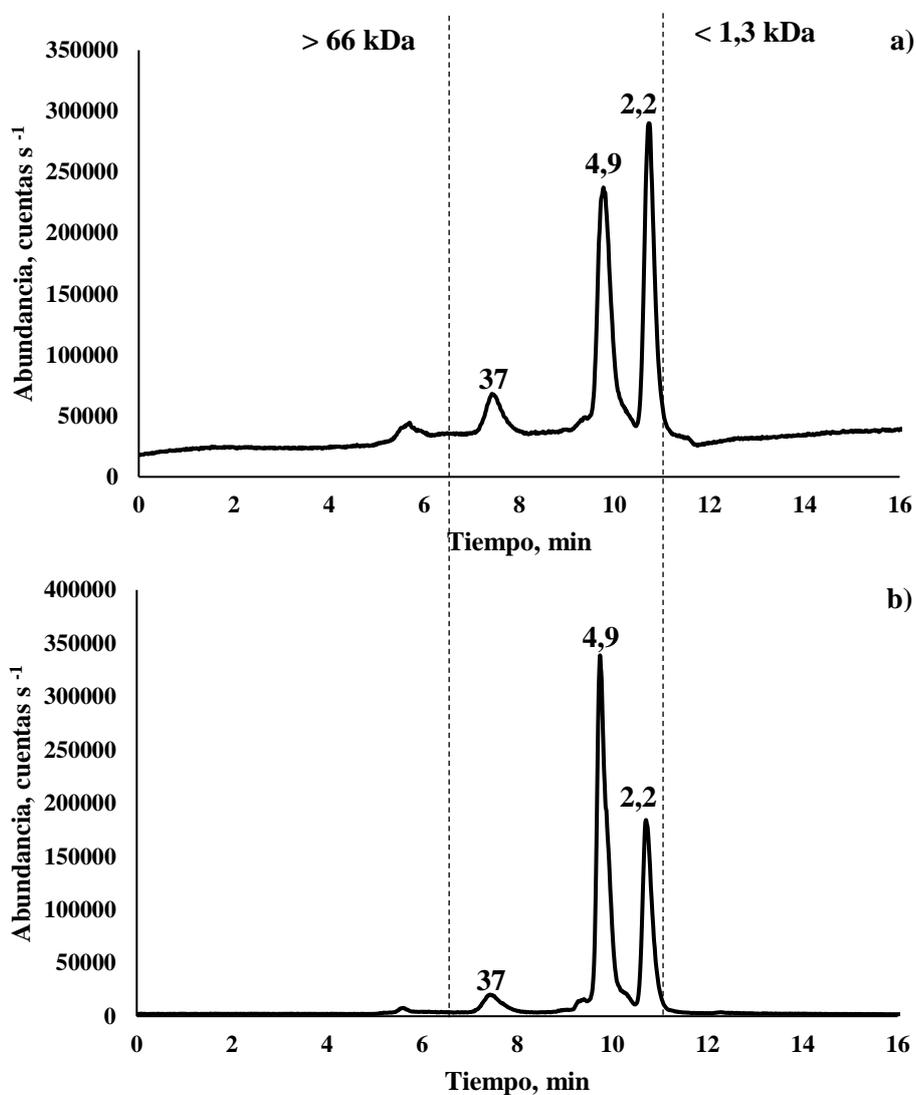
Previo al fraccionamiento por SEC, las muestras de ajo se trataron con una solución de NaOH para extraer las proteínas asociadas con Se y los extractos obtenidos fueron analizados. Se observó que el Se se asoció a una fracción de alto peso molecular (37 kDa) y otra de bajo peso molecular (2-5 kDa) (Fig. 3.1.2, a). Las fracciones de alto

peso molecular corresponden a proteínas de alto peso molecular, y las fracciones de bajo peso molecular corresponden a la presencia de proteínas de bajo peso molecular, Se-aminoácidos libres y posiblemente Se inorgánico que generalmente es extraído bajo condiciones alcalinas. Resultados similares han sido reportados previamente para otras plantas como la cebolla, donde el Se también se asoció a ambas fracciones de alto y bajo peso molecular (Shah et al., 2004; Wróbel et al., 2004).

Las plantas del género *Allium*, tales como el ajo y la cebolla, tienen la capacidad de acumular y metabolizar Se siguiendo el mismo camino que S (Pilon-Smits and Quinn, 2010). Este tipo de plantas son consideradas hiperacumuladoras dado que metabolizan al Se en aminoácidos no proteicos (Se-MeSeCys y  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys) y en proteínas no esenciales para evitar la toxicidad del Se (Pilon-Smits and Quinn, 2010; Pyrzynska, 2009). De otro modo, en plantas no acumuladoras, el Se es metabolizado en SeMet y SeCys, pudiendo así reemplazar a metionina y cisteína en proteínas esenciales, lo cual contribuye a una mayor toxicidad para este tipo de plantas (Rayman et al., 2008).

Por lo que, en el caso del presente estudio realizado en ajo, la asociación de Se principalmente a fracciones de proteína de bajo peso molecular puede explicarse por estas diferencias en la metabolización de Se, pero también a la forma en que las plantas de ajo fueron complementadas con Se durante su cultivo. Se ha observado que la presencia de Se(VI) favorece la presencia de fracciones de bajo peso molecular mientras que la presencia de Se(IV) favorece a aquellas de alto peso molecular (Kápolna et al., 2007; Wróbel et al., 2004). Por otro lado, la mayor proporción de fracciones de bajo peso molecular podría atribuirse a la capacidad de Se(VI) de activar enzimas específicas que hidrolizan proteínas presentes en la fracción de alto peso molecular (Wróbel et al., 2004). Por otro lado, las fracciones moleculares asociadas con Se de las cuatro variedades clonales ensayadas se muestran en las Figuras 3.1.3 y 3.1.4. De esta manera, no se

encontraron diferencias significativas en las fracciones moleculares asociadas a Se en las diferentes variedades clonales.



**Figura 3.1.3:** Cromatogramas de exclusión de tamaño obtenidos por SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) que muestran la asociación de Se a diferentes fracciones de peso molecular en variedades clonales blancas. a) Unión y b) Nieve

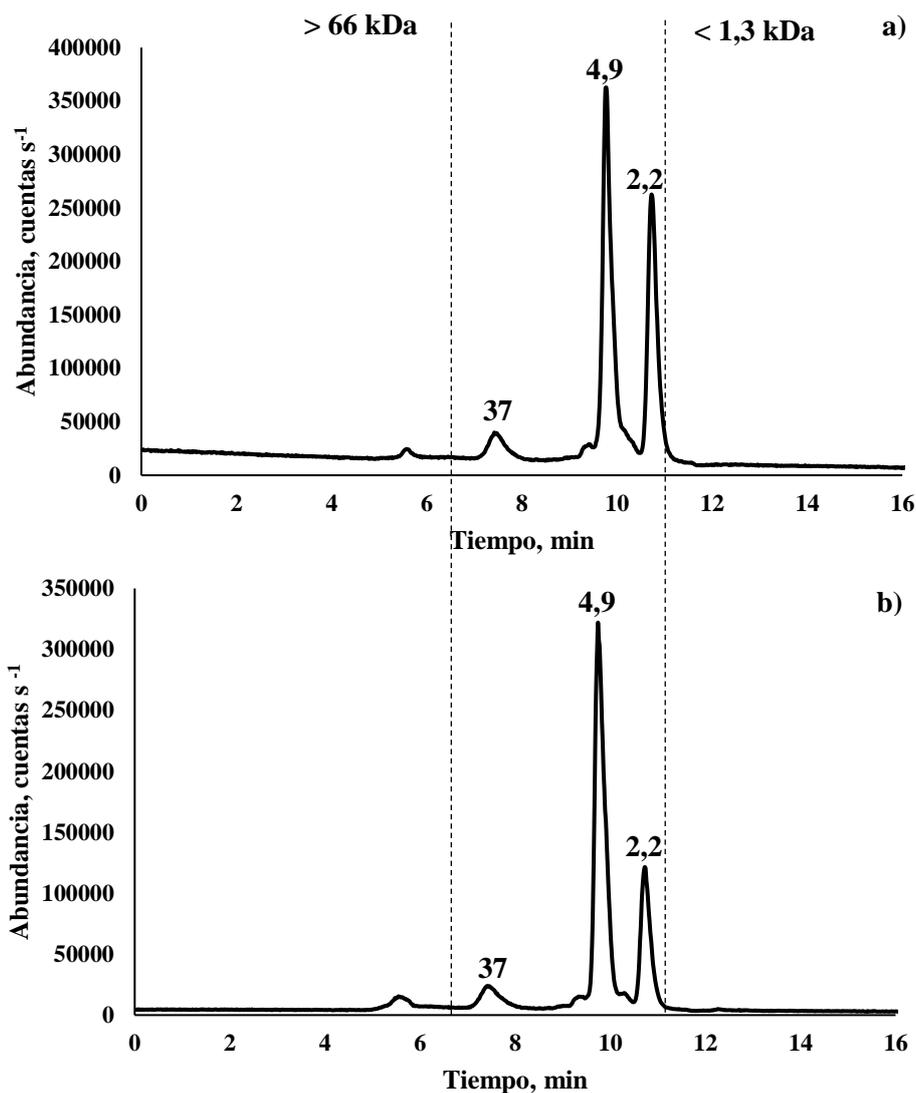


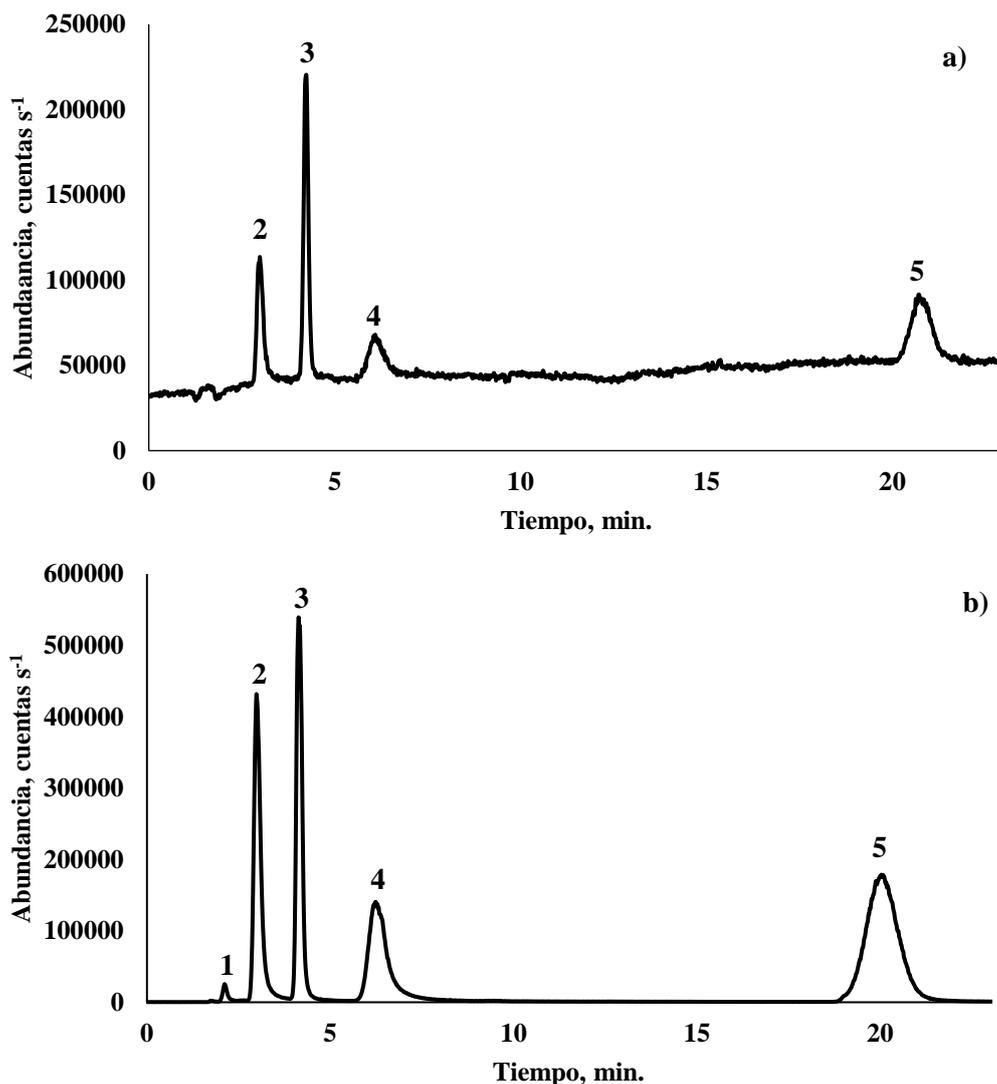
Figura 3.1.4: Cromatogramas de exclusión de tamaño obtenidos por SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) que muestran la asociación de Se a diferentes fracciones de peso molecular en variedades clonales coloradas. a) Gostoso y b) Rubí

### 3.1.4-DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES ORGÁNICAS E INORGÁNICAS DE Se PRESENTES EN LAS VARIEDADES CLONALES

Como los Se-aminoácidos y las especies inorgánicas de Se son iónicas dentro un amplio rango de pH, la separación AEC acoplada a la detección ICP-MS fue elegida para el estudio el análisis de especiación Se en ajos sometidos a diferentes dosis de Se. Una fase móvil compuesta de un buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH 6 fue seleccionada inicialmente para la separación de las especies de Se. Además, se fijó un caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  para todos

los estudios de separación ya que este valor era altamente compatible con la introducción óptima de la muestra en el instrumento de ICP-MS. El efecto de la concentración de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sobre la separación de especies Se fue evaluado en el rango de 20 a 40 mM, obteniendo una separación cromatográfica óptima a 30 mM. Las concentraciones por debajo de este rango llevaron a tiempos de retención muy altos, mientras que concentraciones más altas causaron la superposición de picos. Un cromatograma típico obtenido después de la inyección de una mezcla de estándares de Se y de una muestra adicionada bajo las condiciones mencionadas se muestran en la Figura 3.1.5.

También es digno de mención que la separación AEC se desarrolló sin adición de disolventes orgánicos en la fase móvil para evitar la inestabilidad del plasma y deposición de carbono en el cono de muestreo del instrumento ICP-MS, por lo tanto, contribuyendo a la obtención de óptimas cifras de mérito analítico. Los límites de detección (LOD) obtenidos en este trabajo fueron 32, 43, 58 y 15 ng Se  $\text{g}^{-1}$  para Se(IV), Se(VI), SeMet y Se-MeSeCys, respectivamente. Además, se analizaron los blancos de reactivo y no observó la presencia de especies de Se. Las curvas de calibración mostraron una linealidad aceptable ( $R > 0,998$ ) para cada especie de Se. La exactitud del análisis de especiación se evaluó por medio de un estudio de recuperación mediante la adición de estándares de especies de Se en el rango de 10 y 50  $\mu\text{g Se L}^{-1}$ . Los porcentajes de recuperación de las especies varió en el rango de 92 a 103%, confirmando la precisión del método para el análisis de especiación de Se.



**Figura 3.1.5: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se).** a) Mezcla de patrones de 100 µg L<sup>-1</sup> y b) Muestra adicionada de 100 µg L<sup>-1</sup>. 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV)

Con el fin de liberar el Se asociado a las proteínas en las muestras de ajo, se realizó una hidrólisis enzimática con Proteasa XIV antes del análisis por AEC-ICP-MS. La eficiencia de extracción de Se total por hidrólisis enzimática fue del 85%. Finalmente, para confirmar que todas las especies de Se fueron eluidas desde la columna y que no hubo una retención permanente en la fase estacionaria de alguna especie de Se, se realizó un estudio de recuperación de Se del proceso cromatográfico empleado en este trabajo. Para ello, el Se total se determinó en el extracto enzimático inyectado en HPLC y también

en la solución recogida durante la separación por AEC. Este estudio mostró que el 98% del Se que se encontraba en los extractos fue eluído de la columna de HPLC. Por lo tanto, todas las especies de Se presentes en los extractos enzimáticos se detectaron y ninguna especie fue retenida en la columna permanentemente.

Diferentes especies de Se incluyendo, Se-MeSeCys, Se(VI), SeMet y una especie desconocida fueron observadas en las cuatro variedades clonales (Fig. 3.1.6 y 3.1.7). Estos cromatogramas revelan que Se fue metabolizado principalmente en Se(VI). De hecho, entre el 37 y 60% del Se total hallado en los extractos enzimáticos estaba bajo esta forma inorgánica de Se. Entre las formas orgánicas de Se, Se-MeSeCys es la que se encontró en mayor proporción, entre el 15 y 35%, resultado que puede explicarse como un posible mecanismo de desintoxicación de las plantas al metabolizar Se en aminoácidos no proteicos (Drahoňovský et al., 2016). Resultados similares fueron también reportados en zanahoria y en calabaza donde se reportó que el Se aplicado por vía foliar en forma de Se(IV) se convierte de manera más eficiente en especies orgánicas de Se que el Se(VI) (Kápolna et al., 2009; Smrkoľj et al., 2005). Esta diferencia en la tasa de conversión puede ser causada por la demanda de energía necesaria para la reducción de Se(VI) a Se(IV), que es el primer paso en la ruta metabólica del Se (Burnell, 1981). Por lo que, si bien la aplicación foliar de Se no afecta significativamente el rendimiento de las plantas y se consigue un incremento significativo en el contenido de Se en las plantas, esta no sería una opción óptima para biofortificación debido a que las especies inorgánicas de Se son más tóxicas que las formas orgánicas.

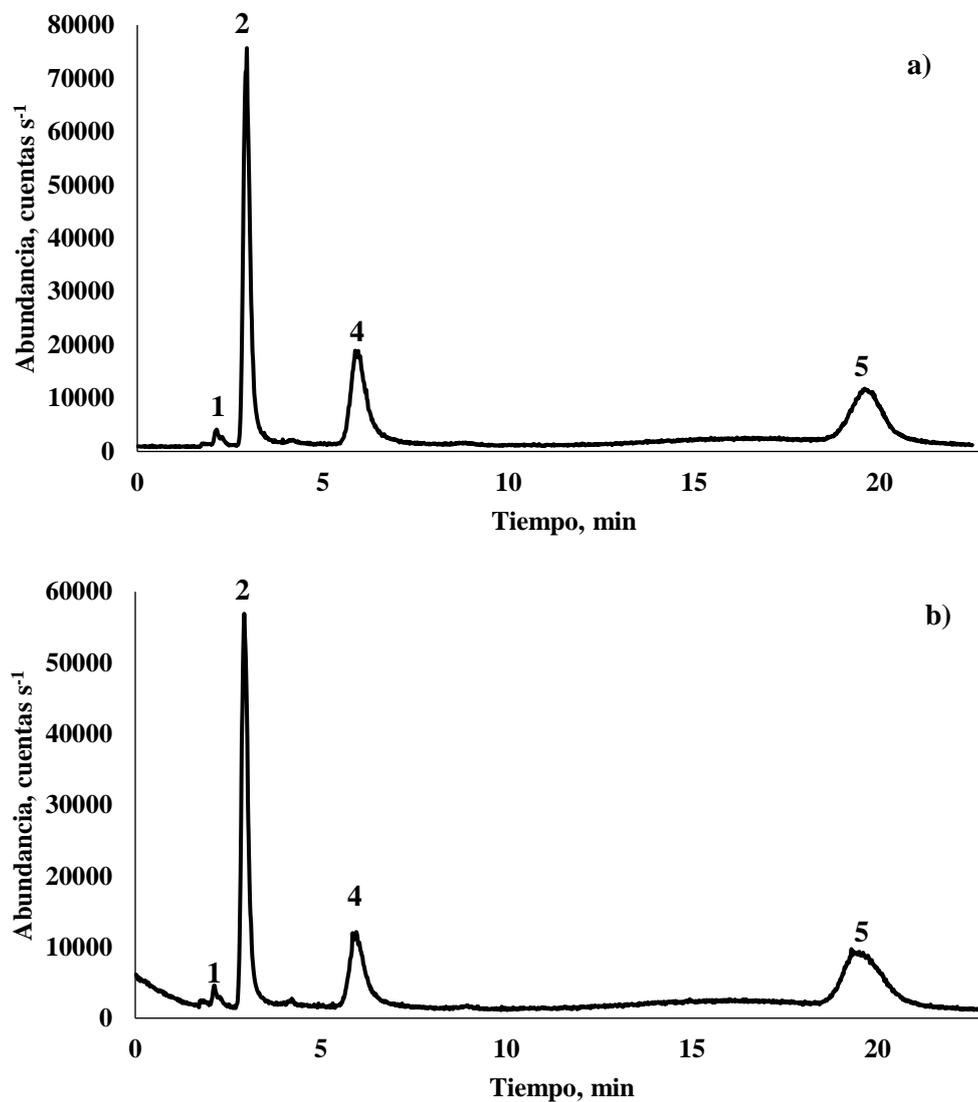
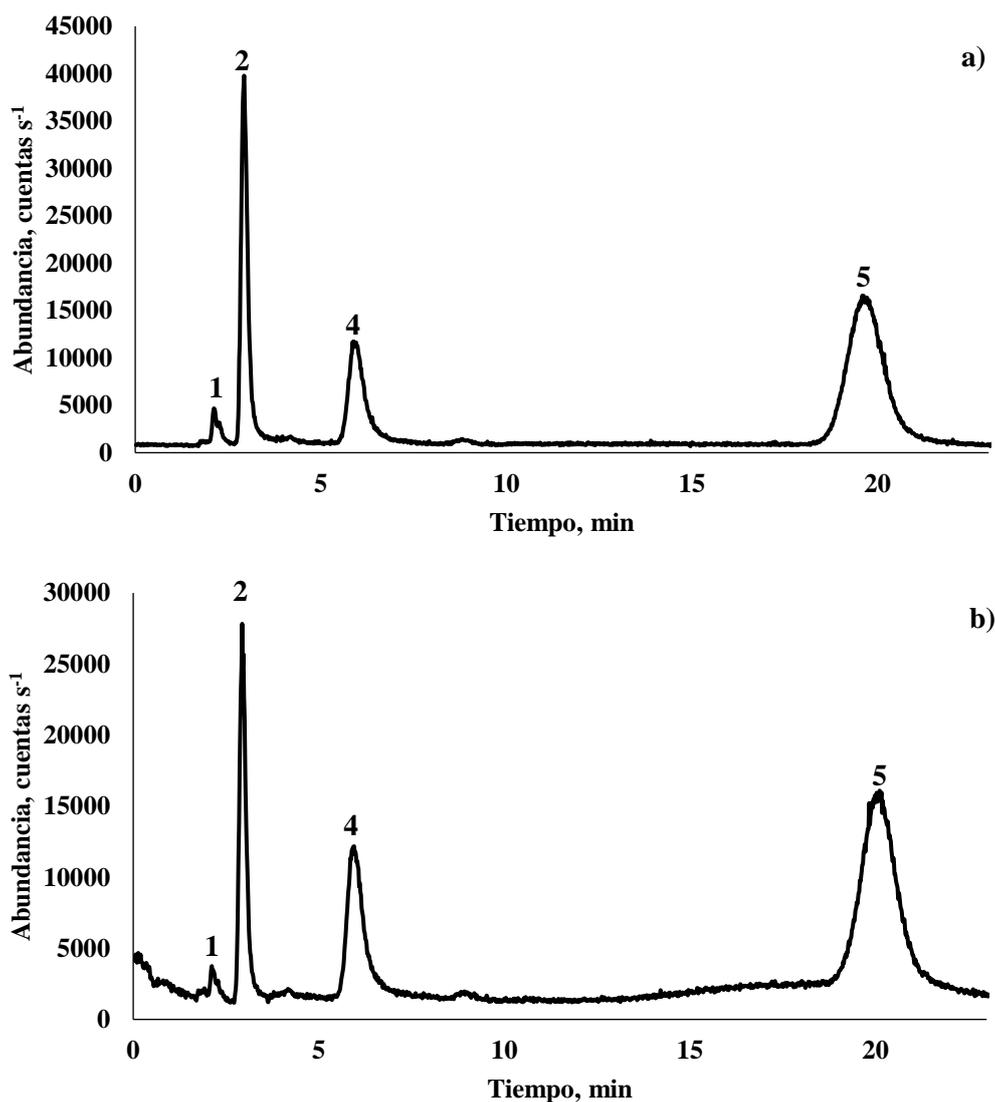
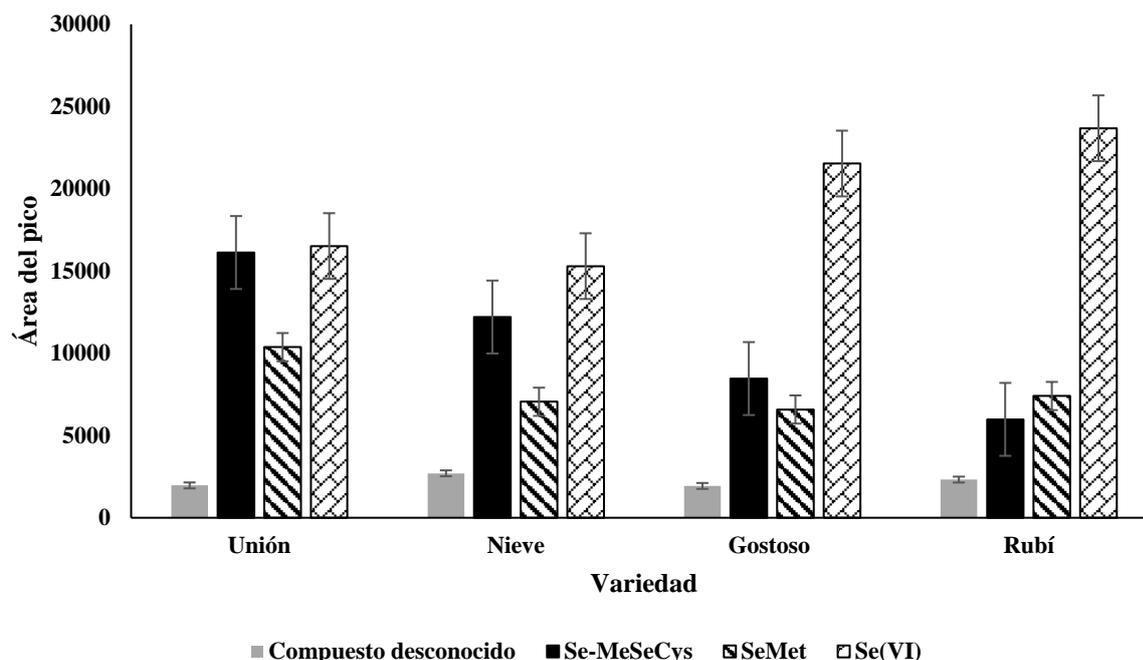


Figura 3.1.6: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) en variedades clonales blancas. a) Unión y b) Nieve. 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV)



**Figura 3.1.7: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) en variedades clonales coloradas.**  
 a) Gostoso y b) Rubi. 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV)

También se pudo observar diferencias en el contenido de las especies de Se en las variedades clonales (Fig. 3.1.8), donde las variedades blancas mostraron mayor eficiencia en transformar el Se a formas orgánicas que las variedades coloradas cuando fueron tratadas por vía foliar. De hecho, las variedades blancas metabolizaron alrededor del 61% del Se en formas orgánicas que las coloradas, que solo lo hicieron en un 40%. Por lo tanto, variedades blancas serían una mejor opción que las variedades coloradas para biofortificar con Se aplicado en forma foliar.



**Figura 3.1.8: Especies de Se presentes en bulbos de cuatro variedades clonales de ajo.** Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.

### 3.1.5- BIBLIOGRAFÍA

Arnault, I., Auger, J., 2006. Seleno-compounds in garlic and onion. *J. Chromatogr. A* 1112, 23–30.

Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244.

Burba, J.L., 2013. 100 Temas Sobre La Producción De Ajo, INTA. ed.

Burnell, J.N., 1981. Selenium metabolism in *Neptunia amplexicaulis*. *Plant Physiol.* 67, 316–324.

De Martino, A., Filomeni, G., Aquilano, K., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., 2006. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem.* 17, 742–749.

Drahoňovský, J., Száková, J., Mestek, O., Tremlová, J., Kaňa, A., Najmanová, J., Tlustoš, P., 2016. Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ. Exp. Bot.* 125, 12–19.

Germ, M., Stibilj, V., Osvald, J., Kreft, I., 2007. Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55, 795–798.

Hawrylak-Nowak, B., 2008. Enhanced selenium content in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by foliar fertilization. *Veg. Crop. Res. Bull.* 69, 63–72.

Ježek, P., Hlušek, J., Lošák, T., Jůzl, M., Elzner, P., Kráčmar, S., Buňka, F., Mårtensson, A.M., 2011. Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant, soil Environ.* 57, 315–320.

Kápolna, E., Hillestrøm, P.R., Laursen, K.H., Husted, S., Larsen, E.H., 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem.* 115, 1357–1363.

Kápolna, E., Shah, M., Caruso, J.A., Fodor, P., 2007. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chem.* 101, 1398–1406.

Kieliszek, M., Błażej, S., 2013. Selenium: significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29, 713–718.

Li, X., Li, B., Yang, Y., 2018. Effects of foliar selenite on the nutrient components of turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* Linn.). *Front. Chem.* 6, 42.

Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F., 2010. Selenium metabolism in plants, in: *Cell*

Biology of Metals and Nutrients. Springer, pp. 225–241.

Poggi, V., Arcioni, A., Filippini, P., Pifferi, P.G., 2000. Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): Effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4749–4751.

Pyrzynska, K., 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.* 114, 1183–1191.

Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M., 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br. J. Nutr.* 100, 238–253.

Shah, M., Kannamkumarath, S.S., Wuilloud, J.C.A., Wuilloud, R.G., Caruso, J.A., 2004. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 381–386.

Smrkoj, P., Stibilj, V., Kreft, I., KAPOLNA, E., 2005. Selenium species determination in selenium-enriched pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by HPLC-UV-HG-AFS. *Anal. Sci.* 21, 1501–1504.

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 57, 134–144.

Wróbel, K., Wróbel, K., Kannamkumarath, S.S., Caruso, J.A., Wysocka, I.A., Bulska, E., Świątek, J., Wierzbicka, M., 2004. HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves—a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chem.* 86, 617–623.

Xu, J., Hu, Q., 2004. Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium-enriched rice. *J. Agric. Food Chem.*

52, 1759–1763.

### 3.2- ESTUDIOS DE ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE Se EN PLANTAS DE AJO DURANTE SU CRECIMIENTO

Aunque el ajo biofortificado con Se es una opción atractiva para aumentar de forma natural la ingesta de Se en humanos, existen pocos estudios acerca de la absorción y acumulación durante el crecimiento de la planta (Cheng et al., 2016; Ogra et al., 2015; Poldma et al., 2011). Además, la aplicación de Se puede mejorar la calidad y rendimiento de la planta, dado que, el Se tiene un efecto antioxidante en las plantas que depende de la dosis de Se (Zhao et al., 2013). Por lo que, una dosis óptima de Se podría jugar un papel positivo en el rendimiento de la planta y la calidad nutricional, mientras que una dosis alta puede ser perjudicial para la planta (Xue et al., 2001). Por lo tanto, es importante investigar la tolerancia del ajo frente a diferentes dosis de Se y el tiempo exacto para la aplicación de Se, a los efectos de obtener un enriquecimiento óptimo de las plantas sin afectar su desarrollo. Por otro lado, el Se puede influir en la acumulación de macronutrientes y micronutrientes implicados en la regulación oxidativa de las células, de forma que, la biofortificación es factible solo si el contenido de Se no tiene influencia negativa en la captación de otros elementos esenciales (Longchamp et al., 2015).

De esta manera, en el presente trabajo de tesis doctoral se investigó la absorción y acumulación de Se en diferentes momentos del crecimiento del ajo, evaluando los efectos de diferentes tratamientos con Se sobre el desarrollo agronómico de la planta, así como en la absorción y acumulación de otros nutrientes minerales. El objetivo en este caso fue comprender mejor el papel del Se y su influencia en el desarrollo de las plantas de ajo. Para ello dos variedades clonales fueron estudiadas. Una variedad clonal colorada, Rubí INTA y una variedad clonal blanca, Nieve INTA. Los ensayos se realizaron durante las campañas 2014 y 2016 bajo las condiciones indicadas en los apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.3, respectivamente. El efecto del Se sobre el desarrollo de las plantas y su

acumulación se evaluó en tres momentos del desarrollo, al inicio (4 de septiembre, crecimiento vegetativo inicial), en el medio (16 de octubre, crecimiento vegetativo) y al final (5 de diciembre, final de la bulbificación). Los resultados se exponen a continuación.

### **3.2.1- DISTRIBUCIÓN DE Se EN DIFERENTES ÓRGANOS DE PLANTAS DE AJO DURANTE SU CRECIMIENTO**

La concentración de Se fue evaluada mediante HG-AFS a lo largo de todo el ciclo de crecimiento, en tres órganos de la planta (hojas, bulbo y raíces). Las condiciones instrumentales se exponen en la Tabla 2.5.1 y detalles sobre la optimización del método se ilustran en la sección 3.1.2.

La concentración de Se en los órganos del ajo se resume en la Tabla 3.2.1. Ambas variedades clonales mostraron altas concentraciones de Se, siendo mayores en la variedad colorada (Rubí INTA), por lo que puede establecerse que serían más eficientes para acumular Se. A diferencia de lo reportado en la sección 3.1, donde el Se fue incorporado en forma foliar y donde las cuatro variedades clonales no mostraron diferencias significativas en la acumulación de Se. Esto puede deberse a que el tiempo de exposición de las plantas es mayor cuando el Se se incorpora al sustrato. Resultados similares fueron reportado en arroz, donde inclusive la aplicación de Se al sustrato mostró ser más eficiente que la aplicación foliar (Boldrin et al., 2013). Además, se puede observar que la concentración de Se en las plantas de ajo se incrementó a medida que aumenta la dosis de Se aplicada, siendo esto más notorio en las variedades coloradas. La habilidad especial del ajo para acumular grandes cantidades de Se es factible debido a la gran similitud química que existe entre Se y S. Resultados similares se han reportado para otras plantas del género *Allium*, tales como cebollas de verdeo, puerros y cebollas (Montes-Bayón et al., 2002; Portela and Cavagnaro, 2004; Schiavon and Pilon-Smits, 2017). Por esta razón,

plantas del género *Allium* se consideran plantas hiperacumuladoras de Se y pueden usarse como fuentes naturales de Se para los humanos. También, se observó que los órganos de la variedad colorada poseen diferentes capacidades de acumular Se, siendo las hojas el órgano que más acumula, mientras que los órganos de la variedad blanca presentan la misma capacidad. Las altas concentraciones de Se en hojas pueden explicarse considerando que este órgano es la terminación del tejido vascular, por lo que es esperable una mayor acumulación de Se (Euliss and Carmichael, 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos también se observó que la concentración de Se cayó entre el segundo y el tercer período de muestreo, lo cual fue más notorio en la variedad colorada. Este comportamiento puede deberse a la formación de compuestos de Se volátiles luego de la acumulación inicial de Se (Montes-Bayón et al., 2002). De hecho, debe mencionarse que las plantas del género *Allium* pueden formar compuestos de Se altamente volátiles, tales como dimetilselenuros (DMSe) y dimetildiedlenuros (DMDSe) (Montes-Bayón et al., 2002).

Por otro lado, el Se no es un elemento esencial para las plantas, pero ellas pueden obtener beneficios de este elemento debido a su poder antioxidante contra las especies reactivas de oxígeno (Jiang et al., 2017; Mora et al., 2015). Estos radicales libres son especies muy reactivas que producen estrés oxidativo, lo que resulta en una acumulación de  $H_2O_2$  que puede inducir una secuencia de reacciones y/o desencadenar una oxidación inespecífica de proteínas, lípidos de membrana o lesión del ADN (Mora et al., 2015). Dichos efectos se evitan con el Se, el cual es un mejor potente antioxidante comparado con el S (Battin et al., 2011). Por lo tanto, puede asegurarse que la suplementación de Se no solo es buena para la salud humana sino también para las plantas.

**Tabla 3.2.1:** Concentración de Se en hojas, bulbo y raíces en diferentes momentos del desarrollo del ajo.

<i>Concentración de Se (<math>\mu\text{g Se g}^{-1}\text{peso seco}</math>)<sup>a</sup></i>		
	Variedad colorada (Rubí INTA)	Variedad blanca (Nieve INTA)
4 de septiembre (crecimiento vegetativo inicial)	15,7	16,3
16 de octubre (crecimiento vegetativo)	57,4	31,8
5 de diciembre (final de la bulbificación)	16,8	30,5
DSM	9,4	15,5
Significancia	Sig.	Sig.
Se <sub>0</sub>	1,6	1,2
Se <sub>1</sub>	28,3	36,2
Se <sub>2</sub>	40,4	36,8
Se <sub>3</sub>	49,6	30,6
DMS	12,0	19,6
Significancia	Sig.	Sig.
Hojas	42,4	35,4
Bulbo	23,0	21,6
Raíces	24,6	21,7
DMS	9,4	15,4
Significancia	Sig.	NSig.
CV	55,5	95,0

<sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.  
 Se<sub>0</sub>: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>1</sub>: 5 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>2</sub>: 5 kg ha<sup>-1</sup>; Se<sub>3</sub>: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>; DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación; s: significativo; NSig.: no significativo.

### 3.2.2-ACUMULACIÓN DE Se EN DIFERENTES ÓRGANOS DE PLANTAS DE AJOS DURANTE SU CRECIMIENTO

La capacidad de ambas variedades clonales para transportar y acumular Se a través del tiempo se evaluó a través del cálculo del factor de traslocación (FT). Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.2. Ambas variedades mostraron un FT muy alto. El alto valor de FT indica que el Se es transportado y acumulado en las plantas con bastante facilidad (Puccinelli et al., 2017). Entonces, el ajo puede considerarse como una planta hiperacumuladora de Se. Además, el FT aumentó con el tiempo de exposición al Se y disminuyó al aumentar la dosis de Se aplicada. Esta disminución puede deberse a que la tolerancia al Se es baja debido a su toxicidad a altas concentraciones (Brown and Shrift, 1982). Resultados similares se encontraron en girasol, mientras que en plantas de albahaca los resultados fueron opuestos, donde se encontró que el FT disminuyó en el tiempo debido a la senescencia de la raíz (Garousi et al., 2016; Puccinelli et al., 2017). No obstante, la variedad colorada muestra valores de FT más altos que la variedad blanca, pudiendo significar que estas primeras son más eficientes para acumular y transportar Se cuando este es aplicado en el sustrato.

**Tabla 3.2.2:** Factor de translocación (concentración de Se en hojas / concentración de Se en raíces) durante el crecimiento del ajo.

<i>Factor de translocación (FT)<sup>a</sup></i>		
	Variedad colorada (Rubí INTA)	Variedad blanca (Nieve INTA)
4 de septiembre (crecimiento vegetativo inicial)	4,2	1,6
16 de octubre (crecimiento vegetativo)	1,6	1,7
5 de diciembre (final de la bulbificación)	10,8	8,7
DMS	4,5	5,8
Significancia	Sig.	Sig.
Se <sub>1</sub>	9,1	1,3
Se <sub>2</sub>	4,0	8,6
Se <sub>3</sub>	3,5	2,1
DMS	4,5	5,7
Significancia	Sig.	Sig.
Se <sub>1</sub> x 4 de septiembre	5,0	1,0
Se <sub>2</sub> x 4 de septiembre	2,5	1,2
Se <sub>3</sub> x 4 de septiembre	19,8	2,7
Se <sub>1</sub> x 16 de octubre	4,3	2,0
Se <sub>2</sub> x 16 de octubre	1,5	1,0
Se <sub>3</sub> x 16 de octubre	6,1	2,0
Se <sub>1</sub> x 5 de diciembre	3,3	0,9
Se <sub>2</sub> x 5 de diciembre	0,8	3,5
Se <sub>3</sub> x 5 de diciembre	6,4	1,6
DMS	7,9	14,6
Significancia	NSig	NSig.
CV	82,9	79,8

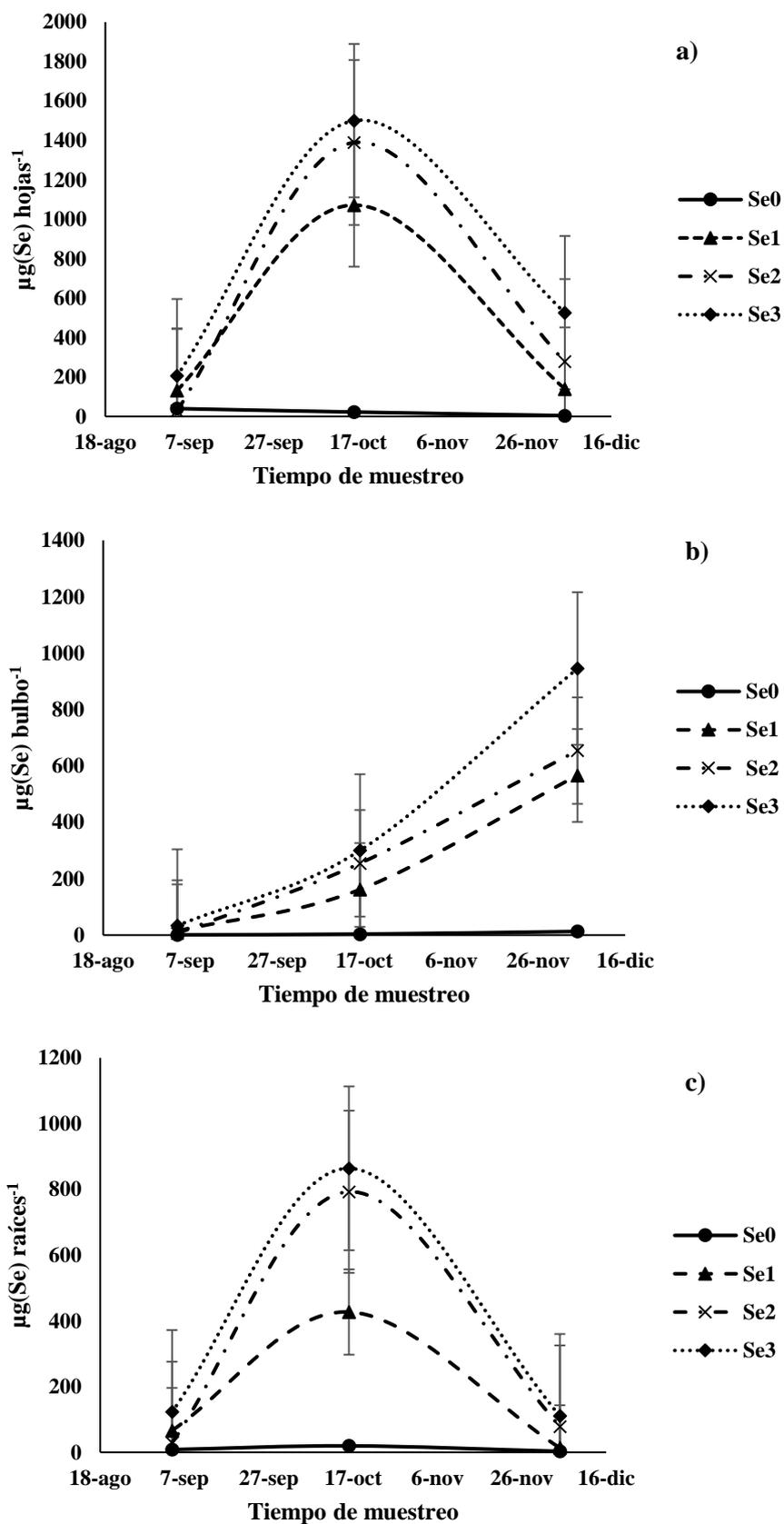
<sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.

Se<sub>0</sub>: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>1</sub>: 5 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>2</sub>: 5 kg ha<sup>-1</sup>; Se<sub>3</sub>: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>; DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación; s: significativo; NSig.: no significativo.

En base a los resultados de porcentaje de sólidos y de concentración de Se, la acumulación total de dicho elemento fue calculada en cada órgano a medida que la planta se desarrollaba multiplicando la concentración de Se por el peso seco de cada órgano. Los resultados se exponen en las figuras 3.2.1 y 3.2.2. El comportamiento del Se fue similar en ambas variedades, sin embargo, la variedad colorada mostró mayor acumulación.

Resulta evidente entonces que las hojas, bulbos y raíces acumulan Se de diferente manera. El contenido de Se aumenta en bulbos a medida que pasa el tiempo, mientras que en hojas y raíces la acumulación de Se aumenta hasta un valor máximo y luego disminuye. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que el ciclo de crecimiento de las plantas de ajo tiene cuatro etapas diferentes y bien definidas (Burba, 2013). La primera etapa es la dormición y corresponde a la situación en que no hay actividad biológica (Maroto Borrego, 2002; Portela and Cavagnaro, 2004). La siguiente es la brotación y es cuando hojas y raíces comienzan a crecer utilizando los nutrientes almacenados en el bulbo (Maroto Borrego, 2002; Portela and Cavagnaro, 2004). Luego de la brotación, comienza el crecimiento vegetativo y es cuando la planta elabora metabolitos importantes, tales como los compuestos de Se y S que poseen propiedades biológicas importantes y beneficiosas para humanos y otros seres vivos. Del mismo modo, las hojas y las raíces crecen rápidamente durante esta etapa (Maroto Borrego, 2002; Portela and Cavagnaro, 2004). Finalmente, la bulbificación que se inicia cuando se detiene la elaboración de metabolitos y estas sustancias se transportan desde las hojas hacia el bulbo para comenzar su desarrollo (Maroto Borrego, 2002)). Cabe destacar que todas estas etapas se ven fuertemente afectadas por las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura y fotoperíodo) del sitio donde se cultivan las plantas de ajo (Portela and Cavagnaro, 2004)). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral mostraron que la acumulación de Se en plantas de ajo fue similar a la observada para otros

nutrientes esenciales como el S, donde su acumulación en bulbos aumentó rápidamente cuando comenzó la etapa de bulbificación, mientras que disminuyó en hojas y raíces. Por lo tanto, con el objetivo de maximizar la acumulación de Se en las partes comestibles de la planta de ajo, es decir, el bulbo, se puede afirmar que el Se debe aplicarse antes de la bulbificación, ya que en este momento específico es donde se detienen la acumulación de Se y el proceso de metabolización de este elemento.



**Figura 3.2.1:** Acumulación total de Se ( $\mu\text{g Se}$ ) durante la temporada de crecimiento en diferentes órganos de ajo colorado (Rubí INTA). a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se ha $^{-1}$ . Se1: 5 kg Se ha $^{-1}$ . Se2: 10 kg Se ha $^{-1}$ . Se3: 15 kg Se ha $^{-1}$ .

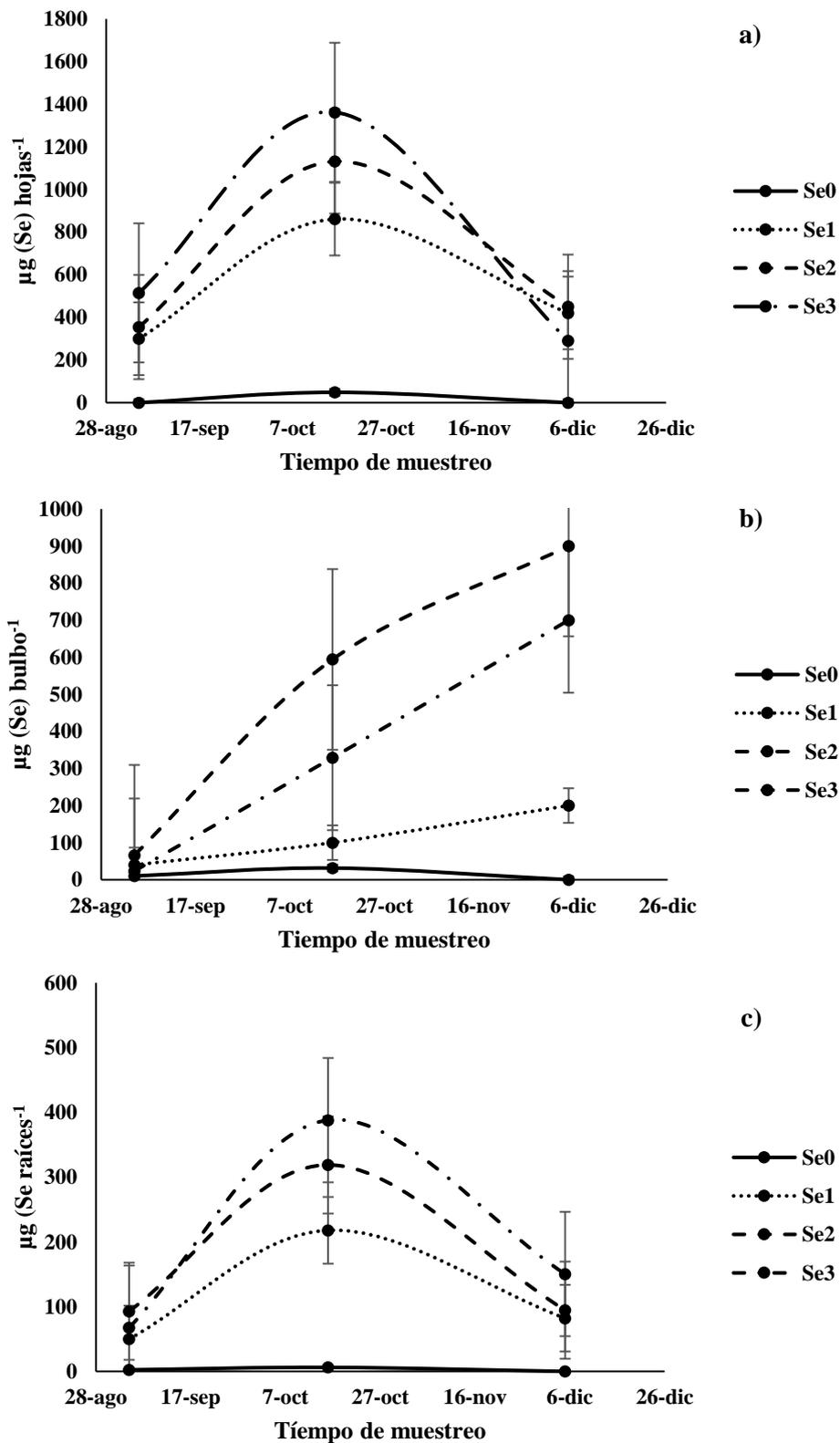


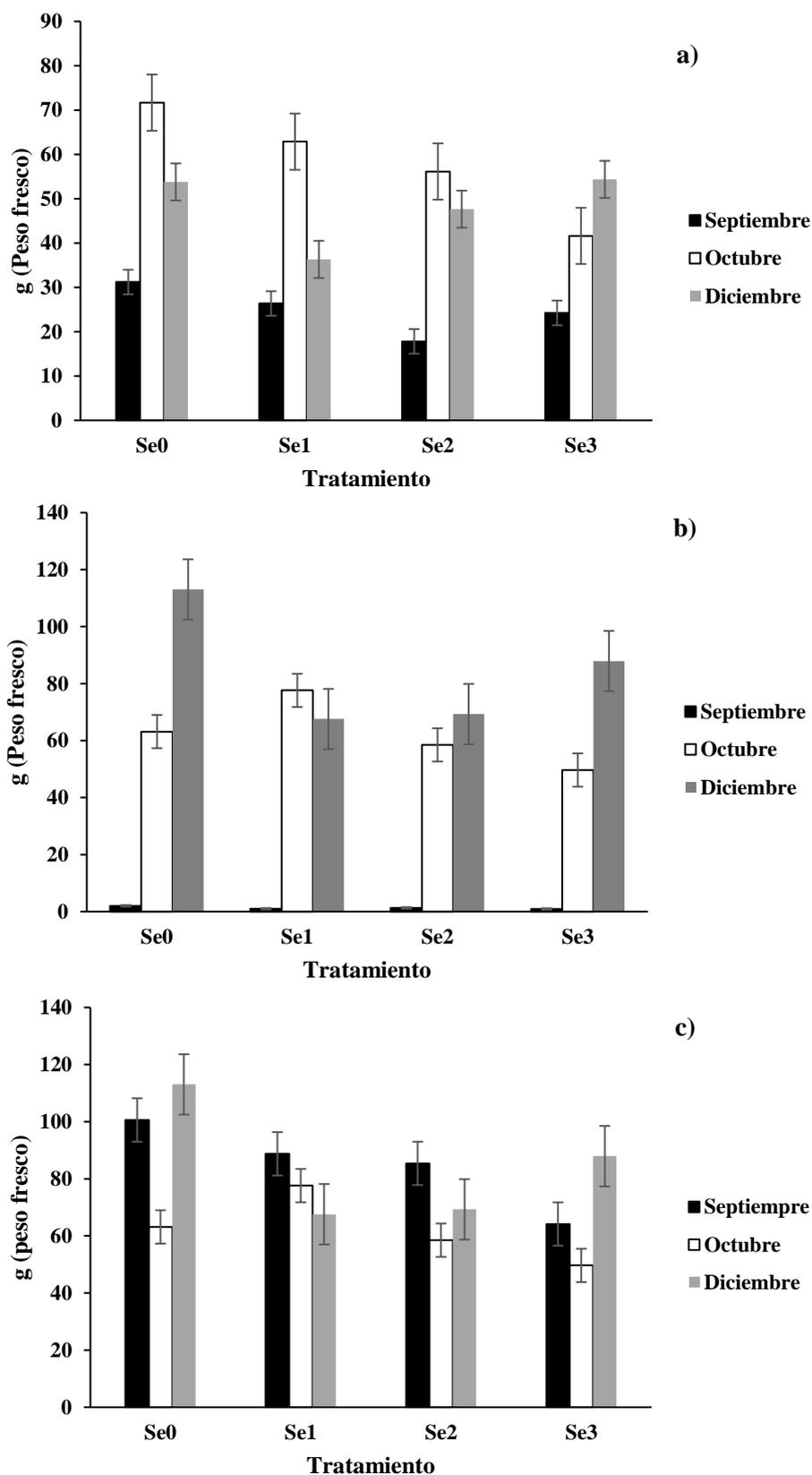
Figura 3.2.2: Acumulación total de Se ( $\mu\text{g Se}$ ) durante la temporada de crecimiento en diferentes órganos de ajo blanco (Nieve INTA). a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se  $\text{ha}^{-1}$ . Se1: 5 kg Se  $\text{ha}^{-1}$ . Se2: 10 kg Se  $\text{ha}^{-1}$ . Se3: 15 kg Se  $\text{ha}^{-1}$ .

Los resultados informados en este trabajo han demostrado que la acumulación de Se en las plantas de ajo no solo depende de las dosis de Se, sino también, de la etapa del desarrollo de la planta y de la variedad clonal.

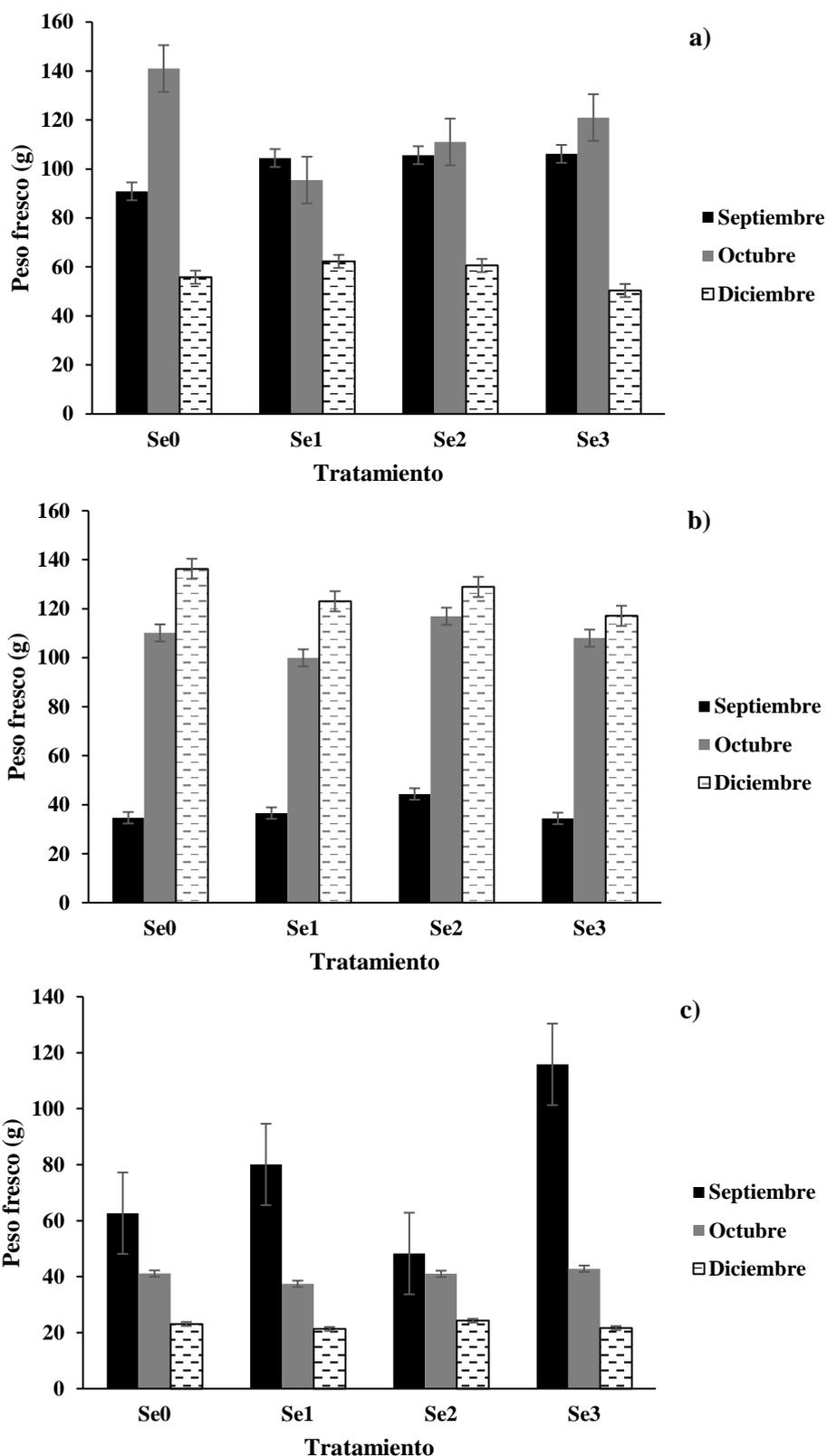
### **3.2.3-EFECTO DEL Se SOBRE EL PESO FRESCO DE LAS PLANTAS DE AJO**

El peso fresco es un parámetro importante ha ser evaluado cuando se realiza la fortificación, ya que, como se explicó anteriormente, los beneficios generados por el cultivo del ajo se basan en la cantidad de ajo producido. Consecuentemente, en este trabajo se determinó el peso fresco de los órganos de ajos colorados y blancos (hojas, bulbos y raíces) en diferentes momentos del crecimiento de la planta con el objeto de estudiar la tolerancia al Se por dichos órganos. En ambos tipos de ajos no se observaron diferencias significativas en el peso fresco de los órganos tratados con diferentes dosis de Se (Fig.3.2.3 y 3.2.4). Resultados similares han sido reportados en cebolla, donde el efecto del Se sobre el crecimiento fue muy pequeño y en trigo donde el Se no afectó el peso fresco dentro de un rango dado de concentraciones (Arscott and Goldman, 2012; Guerrero et al., 2014). Sin embargo, hay informes en los que el alto contenido de Se estuvo relacionado con la disminución del peso de las plantas (Garousi et al., 2016; Haghghi et al., 2016).

Por otro lado, en la etapa de bulbificación podría observarse una disminución en el peso de las hojas. Este comportamiento puede deberse a que en esta etapa todo proceso metabólico se detiene y la senescencia de las hojas comienza con el desarrollo del bulbo (Brewster, 2008).



**Figura 3.2.3: Peso fresco (g) durante la temporada de crecimiento de ajo colorado (Rubí INTA) biofortificado con Se.** a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se1: 5 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se2: 10 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se3: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>. Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.



**Figura 3.2.4: Peso fresco (g) durante la temporada de crecimiento de ajo blanco (Nieve INTA) biofortificado con Se. a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se1: 5 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se2: 10 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se3: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>. Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.**

Asimismo, se ha reportado que la suplementación con Se también ha promovido el crecimiento de plantas como la lechuga, la soja y la papa (Djanaguiraman et al., 2005; Turakainen et al., 2008; Xue et al., 2001). El efecto promotor del crecimiento producido por el Se puede ser atribuible a sus propiedades antioxidantes (Cheng et al., 2016). Por lo que, los efectos negativos o positivos del Se sobre el crecimiento de la planta dependen de la concentración de Se (Fargasova, 2004). Es así entonces, que existe un rango de concentración de Se en el que el ajo puede enriquecerse sin verse afectado por la toxicidad del elemento.

#### **3.2.4-EFECTO DEL Se SOBRE LA ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE OTROS MACRO Y MICROELEMENTOS**

El efecto del Se sobre la concentración de otros nutrientes (Cu, Fe, Mg, Mn, P, S y Zn) se estudió en la última etapa del crecimiento del ajo para investigar posibles cambios en su acumulación y distribución. Estos nutrientes se estudiaron debido a su notable influencia en el crecimiento del ajo. En este caso la determinación multielemental se realizó en hojas, bulbos y raíces mediante la técnica ICP-MS. El estudio se realizó sobre la variedad clonal colorada (Rubí INTA) tratada con la mayor suplementación de Se para poder observar el mayor cambio en la acumulación en esta variedad que demostró una mayor eficiencia en la acumulación de Se. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.3.

**Tabla 3.2.3:** Concentración de nutrientes en diferentes órganos de plantas de ajo en la última etapa de su crecimiento.

<i>Concentración de nutrientes (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)<sup>a</sup></i>							
	<b>Zn</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>P</b>	<b>S</b>
<b>Se<sub>0</sub></b>	113	470	78,4	3865	26,3	2049	6780
<b>Se<sub>3</sub></b>	1160	390	51,6	2393	19,6	1192	6244
<b>DMS</b>	906	72,4	13,1	932	2,8	459	450
<b>Significancia</b>	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
<b>Hojas</b>	1075	599	31,8	908	20,2	1919	8997
<b>Bulbo</b>	510	151	13,1	272	20,8	2260	5402
<b>Raíces</b>	323	450	150	8205	27,9	682	5288
<b>LSD</b>	1167	88,8	16,1	1142	3,4	563	551
<b>Significancia</b>	NSig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
<b>Se<sub>0</sub>xHojas</b>	88,4	547	35,7	991	23,1	1794	7886
<b>Se<sub>3</sub>xHojas</b>	2062	652	28,0	826	17,3	2044	10107
<b>Se<sub>0</sub>xBulbo</b>	71,5	166	16,7	239	23,2	3173	7043
<b>Se<sub>3</sub>xBulbo</b>	949	135	9,6	305	18,4	1348	3760
<b>Se<sub>0</sub>xRaíces</b>	178	517	183	10364	32,7	1178	5411
<b>Se<sub>3</sub>xRaíces</b>	469	383	117	6047	23,1	186	5165
<b>DMS</b>	1702	127	22,7	1615	4,8	802	780
<b>Significancia</b>	NSig.	Sig.	Sig.	Sig.	NSig.	Sig.	Sig.
<b>CV</b>	112,3	17,2	19,6	29,0	11,9	25,2	6,7

<sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas.

Se<sub>0</sub>: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>1</sub>: 5 kg Se ha<sup>-1</sup>; Se<sub>2</sub>: 5 kg ha<sup>-1</sup>; Se<sub>3</sub>: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>; DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación; s: significativo; NSig.: no significativo.

Puede apreciarse que la acumulación de S fue 1,3 veces mayor en las hojas de plantas de ajo tratadas con Se que en las hojas de las plantas control, indicando que la suplementación de Se produjo un aumento en la translocación de S desde las raíces hacia las hojas. Sin embargo, la acumulación de S en bulbos y raíces se redujo ante la presencia de Se. Este incremento en las hojas puede ser atribuido a dos mecanismos diferentes. El primero de ellos está asociado principalmente al aumento de la expresión de transportadores SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> debido a la presencia de SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, de modo que el flujo de S aumenta en la vía de asimilación (Boldrin et al., 2016). Asimismo, otro posible mecanismo involucrado en la translocación S debido a Se en el ajo, está relacionado con la

interferencia de Se en la biosíntesis de cisteína (Hawkesford and De Kok, 2007). Esta interferencia produce altas cantidades de o-acetilserina (OAS), que es un intermediario en la biosíntesis de cisteína y regula positivamente la absorción de S (da Silva et al., 2011). Sin embargo, hay una disminución en la concentración de S en los bulbos que podría deberse a una competencia entre S y Se para translocarse hacia este órgano (da Silva et al., 2011). Por lo que el efecto antagónico de Se sobre la acumulación de S se produce cuando S es traslocado desde las hojas hacia el bulbo.

El efecto que tiene el Se sobre la acumulación y distribución de S es un factor importante para considerar, debido a que Se puede reemplazar al S en aminoácidos esenciales como Cys y Met, alterando la estructura de las proteínas y ocasionando un deterioro en sus funciones biológicas (Terry et al., 2000). Además, el Se reduce la tasa de síntesis de proteínas porque la sustitución de Met por SeMet es menos eficiente para la formación de enlaces peptídicos (Eustice et al., 1981). Por otro lado, la formación de Se-aminoácidos aumenta la producción de etileno (Cheng et al., 2016). Esta fitohormona produce cambios en la composición lipídica de la membrana y aumenta su permeabilidad, lo que podría afectar los tejidos de la planta (Xue et al., 2001).

La acumulación y distribución de Zn, Cu, Mg, Mn, Fe y P, también se vieron afectadas significativamente por la fortificación de ajo con Se. Los resultados mostraron que el Se tiene un efecto antagonista sobre las concentraciones de Cu, Mg, Mn, Fe y P y un efecto positivo sobre Zn (Tabla 3.2.3). Estos cambios pueden deberse a que el Se evita la acumulación excesiva de cationes como  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ . Por otro lado, el Se tiene la habilidad de generar cambios en la distribución de estos elementos dentro de las plantas para mantener un nivel óptimo de metabolismo celular, particularmente en las partes de la planta que contienen clorofila (Longchamp et al., 2015). Sin embargo, estos cambios podrían ser peligrosos para la planta porque Zn, Fe, Cu y Mn actúan como cofactores en

muchas enzimas antioxidantes (Broadley et al., 2012). Por lo tanto, si las actividades de estas enzimas disminuyen, la sensibilidad de la planta al estrés ambiental aumenta (Gurgul and Herman, 1994). El Mg y el Fe también están relacionados con la síntesis de la feofitina (molécula de clorofila sin Mg) y de la clorofila (Broadley et al., 2012). Por lo tanto, cambios significativos en la concentración de estos elementos producen problemas importantes en las plantas, tal como la clorosis en las hojas (Broadley et al., 2012; da Silva et al., 2011).

La acumulación de P en el ajo se redujo significativamente ante la biofortificación con Se, principalmente porque  $\text{SeO}_3^{-2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  compiten por los mismos transportadores (Zhang et al., 2017). Esto debe considerarse muy especialmente porque las plantas necesitan P para el desarrollo de las raíces y la fotosíntesis de las plantas (Pessarakli, 2005). Los resultados también mostraron que la acumulación de P aumentó en hojas y disminuyó en bulbos y raíces cuando las plantas de ajo fueron tratadas con Se. Estos cambios en la distribución de elementos esenciales como P podría atribuirse a un mecanismo de defensa antioxidante que ayude a mejorar la tolerancia de las plantas al estrés (Feng et al., 2013).

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral permiten confirmar que los cambios ocurridos en la acumulación y distribución de los diferentes nutrientes ante la suplementación con Se, no afectaron significativamente el crecimiento del ajo. Resultados similares se reportaron en girasoles y maíz, donde el efecto del Se sobre la absorción y acumulación de otros nutrientes dependió de la forma química de Se aplicado y de los órganos de la planta (Da Silva et al., 2012; Longchamp et al., 2015).

**3.2.5-BIBLIOGRAFÍA**

Arscott, S., Goldman, I., 2012. Biomass effects and selenium accumulation in sprouts of three vegetable species grown in selenium-enriched conditions. *HortScience* 47, 497–502.

Battin, E.E., Zimmerman, M.T., Ramoutar, R.R., Quarles, C.E., Brumaghim, J.L., 2011. Preventing metal-mediated oxidative DNA damage with selenium compounds. *Metallomics* 3, 503–512.

Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244.

Boldrin, P.F., de Figueiredo, M.A., Yang, Y., Luo, H., Giri, S., Hart, J.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Thannhauser, T.W., Li, L., 2016. Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 158, 80–91.

Brewster, J.L., 2008. Onions and other vegetable alliums. CABI.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Ma, J.F., Rengel, Z., Zhao, F., 2012. Beneficial elements, in: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). Elsevier, pp. 249–269.

Brown, T.A., Shrift, A., 1982. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 59–84.

Burba, J.L., 2013. 100 Temas Sobre La Producción De Ajo, INTA. ed.

Cheng, B., Lian, H., Liu, Y., Yu, X., Sun, Y., Sun, X., Shi, Q., Liu, S., 2016. Effects of Selenium and Sulfur on antioxidants and physiological parameters of garlic

plants during senescence. *J. Integr. Agric.* 15, 566–572.

da Silva, M.A.O., de Andrade, S.A.L., Mazzafera, P., Arruda, M.A.Z., 2011. Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: A comparative metallomic study. *Int. J. Mass Spectrom.* 307, 55–60.

Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, J.A., Bangarusamy, U., 2005. Selenium—an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272, 77–86.

Euliss, K.W., Carmichael, J.S., 2004. The effects of selenium accumulation in hydroponically grown canola (*Brassica napus*). *J Young Invest* 1, 1–12.

Eustice, D.C., Kull, F.J., Shrift, A., 1981. Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. *Plant Physiol.* 67, 1054–1058.

Fargasova, A., 2004. Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. *Plant Soil Environ.* 50, 33–38.

Feng, R., Wei, C., Tu, S., 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 87, 58–68.

Garousi, F., Kovács, B., Andrási, D., Veres, S., 2016. Selenium Phytoaccumulation by Sunflower Plants under Hydroponic Conditions. *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 382.

Guerrero, B., Llugany, M., Palacios, O., Valiente, M., 2014. Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 83, 300–307.

Gurgul, E., Herman, B., 1994. Influence of nitrogen, phosphorus and potassium on chemical composition and activity of some enzymes in celery during its growth. *Biol. Plant.* 36, 261–265.

Haghighi, M., Sheibanirad, A., Pessarakli, M., 2016. Effects of selenium as a beneficial element on growth and photosynthetic attributes of greenhouse cucumber. *J. Plant Nutr.* 39, 1493–1498.

Hawkesford, M.J., De Kok, L.J., 2007. Sulfur in plants. Springer Science & Business Media.

Jiang, C., Zu, C., Lu, D., Zheng, Q., Shen, J., Wang, H., Li, D., 2017. Effect of exogenous selenium supply on photosynthesis, Na<sup>+</sup> accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Sci. Rep.* 7, 42039.

Longchamp, M., Castrec-Rouelle, M., Biron, P., Bariac, T., 2015. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied with selenite or selenate. *Food Chem.* 182, 128–135.

Maroto Borrego, J. V, 2002. Horticultura herbácea especial. Madrid : Mundi-Prensa.

Montes-Bayón, M., Grant, T.D., Meija, J., Caruso, J.A., 2002. Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods Plenary Lecture. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 1015–1023.

Mora, M.L., Durán, P., Acuña, J., Cartes, P., Demanet, R., Gianfreda, L., 2015. Improving selenium status in plant nutrition and quality. *J. soil Sci. plant Nutr.* 15, 486–503.

Ogra, Y., Awaya, Y., Anan, Y., 2015. Comparison of accumulation of four metalloids in *allium sativum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 604–608.

Pessarakli, M., 2005. Handbook of photosynthesis. CRC press.

Poldma, P., Tonutare, T., Viitak, A., Luik, A., Moor, U., 2011. Effect of

selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 59, 5498–5503.

Portela, J.A., Cavagnaro, J.B., 2004. Growing phases of the white garlic (*Allium sativum*) plant in relation to field temperature and day length, in: IV International Symposium on Edible Alliaceae 688. pp. 239–246.

Puccinelli, M., Malorgio, F., Rosellini, I., Pezzarossa, B., 2017. Uptake and partitioning of selenium in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants grown in hydroponics. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 225, 271–276.

Schiavon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2017. The fascinating facets of plant selenium accumulation—biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytol.* 213, 1582–1596.

Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S., 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 51, 401–432.

Turakainen, M., Hartikainen, H., Sarjala, T., Seppänen, M.M., 2008. Impact of selenium enrichment on seed potato tubers. *Agric. Food Sci.* 17, 278–288.

Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V., 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237, 55–61.

Zhang, D., Dong, T., Ye, J., Hou, Z., 2017. Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by coapplication of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Sci. plant Nutr.* 63, 37–44.

Zhao, Y., Wu, P., Wang, Y., Feng, H., 2013. Different approaches for selenium biofortification of pear-jujube (*Zizyphus jujuba* M. cv. Lizao) and associated effects on fruit quality. *J. Food Agric. Environ.* 11, 529–534.

### 3.3-ESTUDIOS DE ESPECIACIÓN DE Se EN DIFERENTES ETAPAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE AJO

La planta de ajo puede acumular y metabolizar grandes cantidades de Se, alrededor de 1000 mg Se kg<sup>-1</sup>, a pesar de que este elemento no es un micronutriente esencial (Bhandari, 2012; Sharma et al., 2007). Esta gran acumulación de Se es debida a que Se y S son químicamente similares por lo que Se es metabolizado por la vía de asimilación de S como ya se explicó anteriormente (Poldma et al., 2011). Sin embargo, la translocación de Se dentro de la planta depende de la forma en que se suministra el elemento en la raíz (Montes-Bayón et al., 2002). De esta forma, por ejemplo el Se(VI) es la fuente de Se más biodisponible para las plantas (Montes-Bayón et al., 2002), puesto que éste además se transporta desde las raíces y se acumula en las hojas donde se metaboliza bajo la forma de aminoácidos proteicos tales como SeMet y SeCys, y aminoácidos no proteicos como Se-MeSeCyst y  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys (Quinn et al., 2011). Estos Se-aminoácidos son precursores del metilselenol, la cual es una de las especies de Se más activas para la prevención del cáncer (Lü et al., 2016).

A pesar de que las plantas del género *Allium*, como el ajo, han sido reportadas como posibles fuentes de Se en la dieta humana, ya que pueden transformar el Se en Se-aminoácidos con funciones biológicas importantes, ninguna investigación se ha enfocado en el metabolismo del Se durante el desarrollo de las plantas ni tampoco se ha evaluado la especiación de Se en la misma (Kápolna and Fodor, 2006; Larsen et al., 2006; Lavu et al., 2012; Tian et al., 2016).

Por lo que, en el presente trabajo de tesis doctoral se investigó la manera en la que se modificó la especiación de Se en los órganos (hojas, bulbos y raíces) de plantas de ajo

tratadas durante las diferentes etapas de su desarrollo, aportando a dilucidar el metabolismo de este importante elemento.

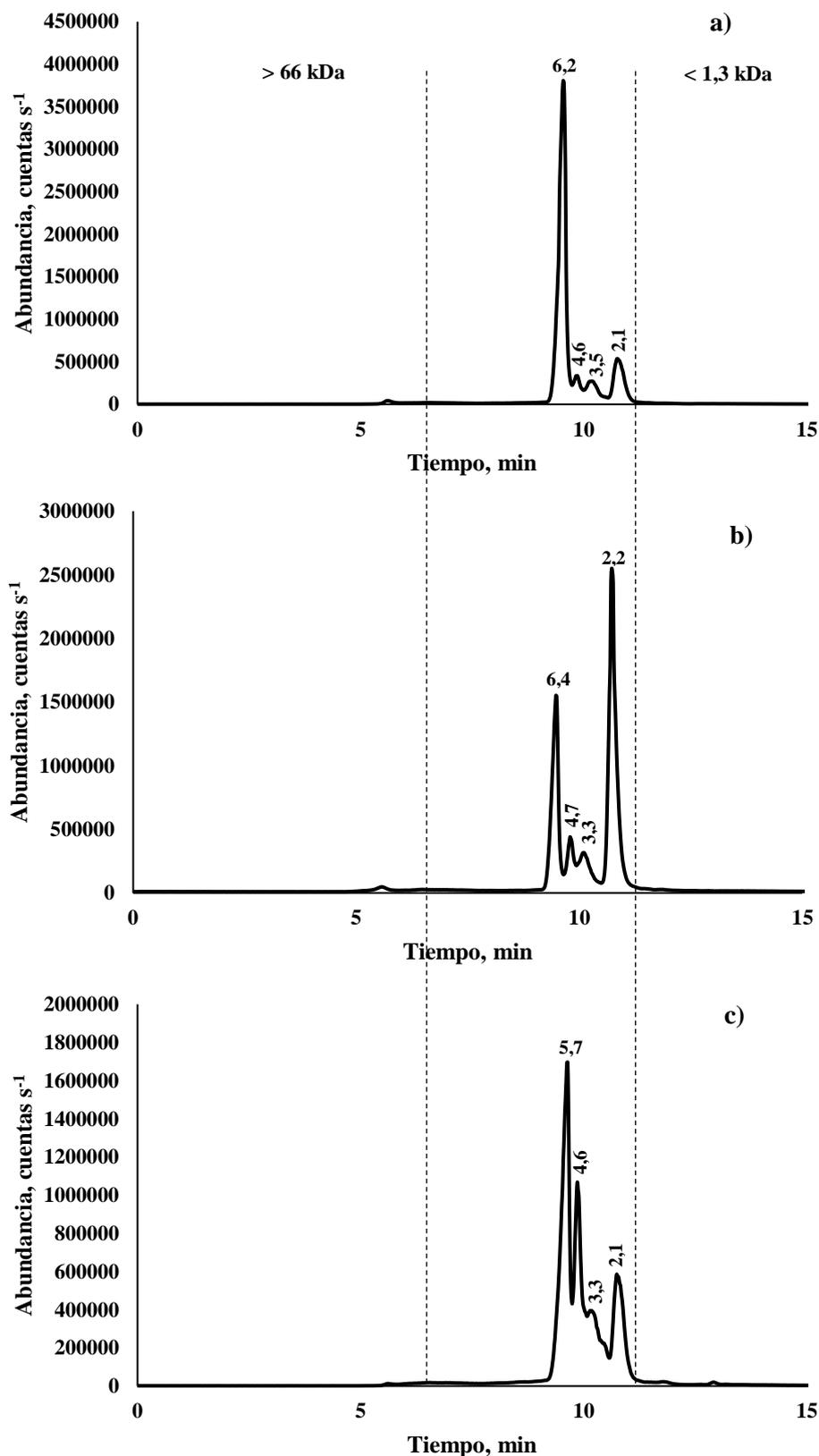
### **3.3.1-DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES PROTEICOS ASOCIADOS CON Se EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO**

Las plantas de ajo con los niveles más altos de Se fueron elegidas para ser analizadas por SEC-ICP-MS. Así, las hojas, bulbos y raíces de diferentes momentos del desarrollo de la planta de ajo se trataron con una solución de NaOH para la extracción de Se-proteínas y los extractos obtenidos se analizaron mediante SEC-ICP-MS. Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 2.5.3.

Los cromatogramas SEC de los órganos de plantas de ajo se muestran de la Figura 3.3.1 a la Figura 3.3.3. Se puede observar que el Se se asoció a fracciones de alto (7-5 kDa) y de bajo peso molecular (2-4 kDa) en hojas, bulbos y raíces. Dichas fracciones corresponden a proteínas de bajo peso molecular, Se-aminoácidos libres y, probablemente, Se inorgánico que normalmente se extraen en condiciones alcalinas (Kápolna et al., 2007; Mounicou et al., 2009). Confirmado los resultados obtenidos en la sección 3.1.3 de la presente tesis. Sin embargo, el comportamiento de las fracciones de alto y de bajo peso molecular fue muy diferente entre los órganos de ajo durante la temporada de crecimiento. En las hojas (Fig. 3.3.1) la fracción de alto peso molecular disminuyó y la fracción de bajo peso molecular aumentó a medida que transcurrió el tiempo, mientras que en los bulbos el comportamiento de estas fracciones fue opuesto (Fig. 3.3.2). Esto puede deberse a que el ajo tiene la capacidad de acumular y metabolizar Se en aminoácidos libres, es decir no asociados a proteínas (p. Ej., Se-MetSeCys y  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys) lo que se puede entender como un mecanismo de las plantas para sobrellevar la toxicidad de Se, como ya se explicó en secciones anteriores (Pilon-Smits

and Quinn, 2010). Estos Se-aminoácidos son transportados desde las hojas hasta el bulbo en la etapa de bulbificación, aumentando la fracción de bajo peso molecular en los mismos, por lo que disminuye en las hojas. Por otro lado, en plantas no acumuladoras de Se, este elemento es metabolizado en SeMet y SeCys, que pueden reemplazar a la metionina y a la cisteína en proteínas que son esenciales para la planta, lo que podrían causar toxicidad del Se en dichas plantas dado que dichas proteínas pierden sus funciones biológicas (Rayman et al., 2008). No obstante, la asociación de Se a las fracciones de bajo peso molecular puede también explicarse por el uso de Se(VI) en la solución de biofortificación dado que se ha observado que en presencia de Se(VI), las fracciones de bajo peso molecular se encuentran en mayor proporción dado que Se(VI) tiene la capacidad de activar enzimas específicas que hidrolizan proteínas presentes en las fracciones de alto peso molecular como también pudo observarse en la sección 3.1.3 (Wróbel et al., 2004).

En las raíces (Fig. 3.3.3), tanto la fracción de alto peso molecular como la de bajo peso molecular disminuyeron entre la primera y la última etapa del desarrollo debido a la presencia de Se(IV) en la solución de biofortificación. La especie Se(IV) fue acumulada rápidamente en las raíces y puede transformarse en formas orgánicas como SeMet, SeOMet y Se-MeSeCys (Li et al., 2008). Estas formas orgánicas son translocadas hacia las hojas, de modo que ambas fracciones disminuyen en la raíz durante el desarrollo del ajo.



**Figura 3.3.1:** Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) de hojas de ajo en diferentes momentos del desarrollo de la planta. a) 4 de septiembre de 2014, b) 16 de octubre de 2014 y c) 5 de diciembre de 2014.

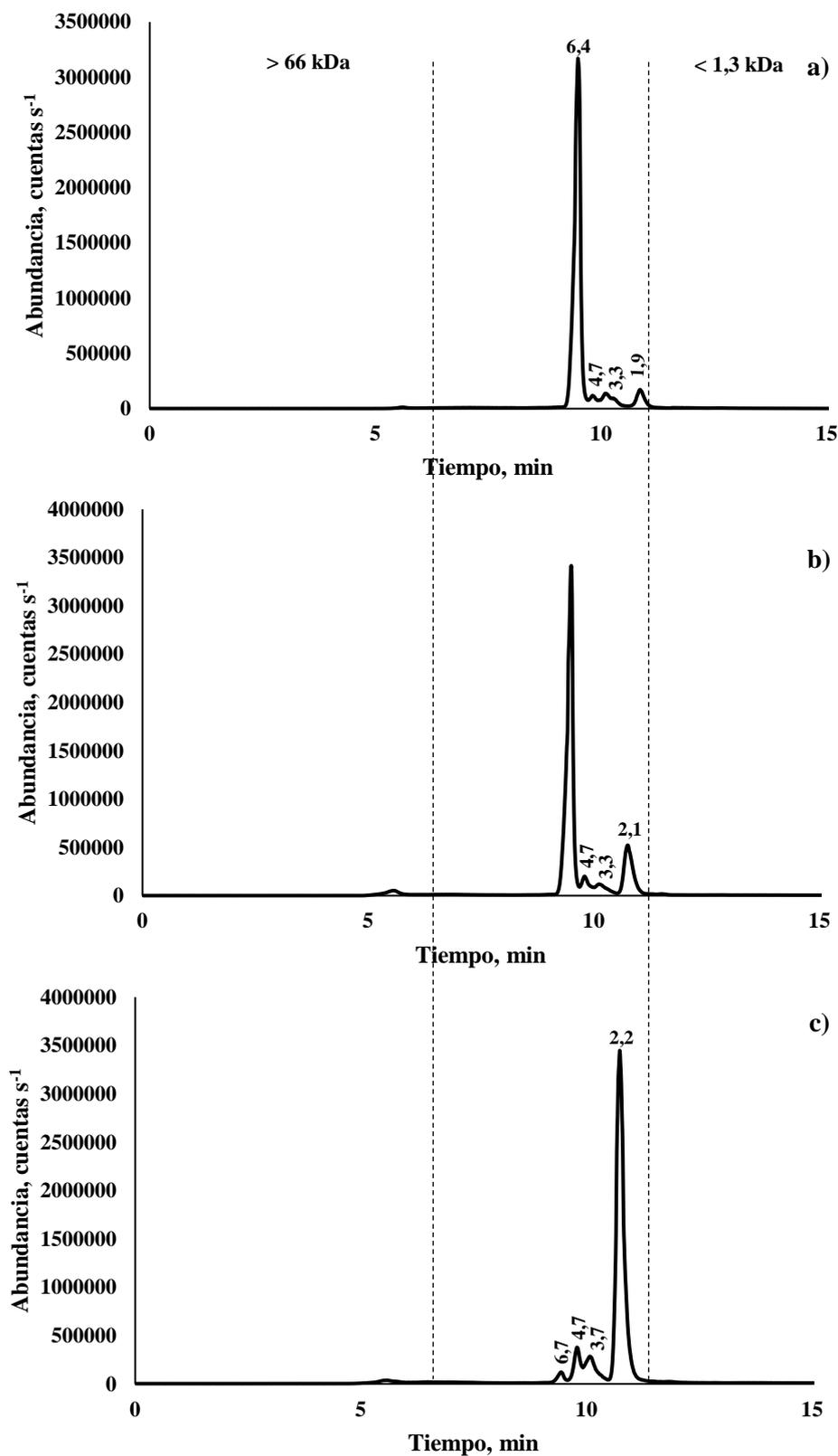


Figura 3.3.2: Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se) de bulbos de ajo en diferentes momentos del desarrollo de la planta. a) 4 de septiembre de 2014, b) 16 de octubre de 2014 y c) 5 de diciembre de 2014.

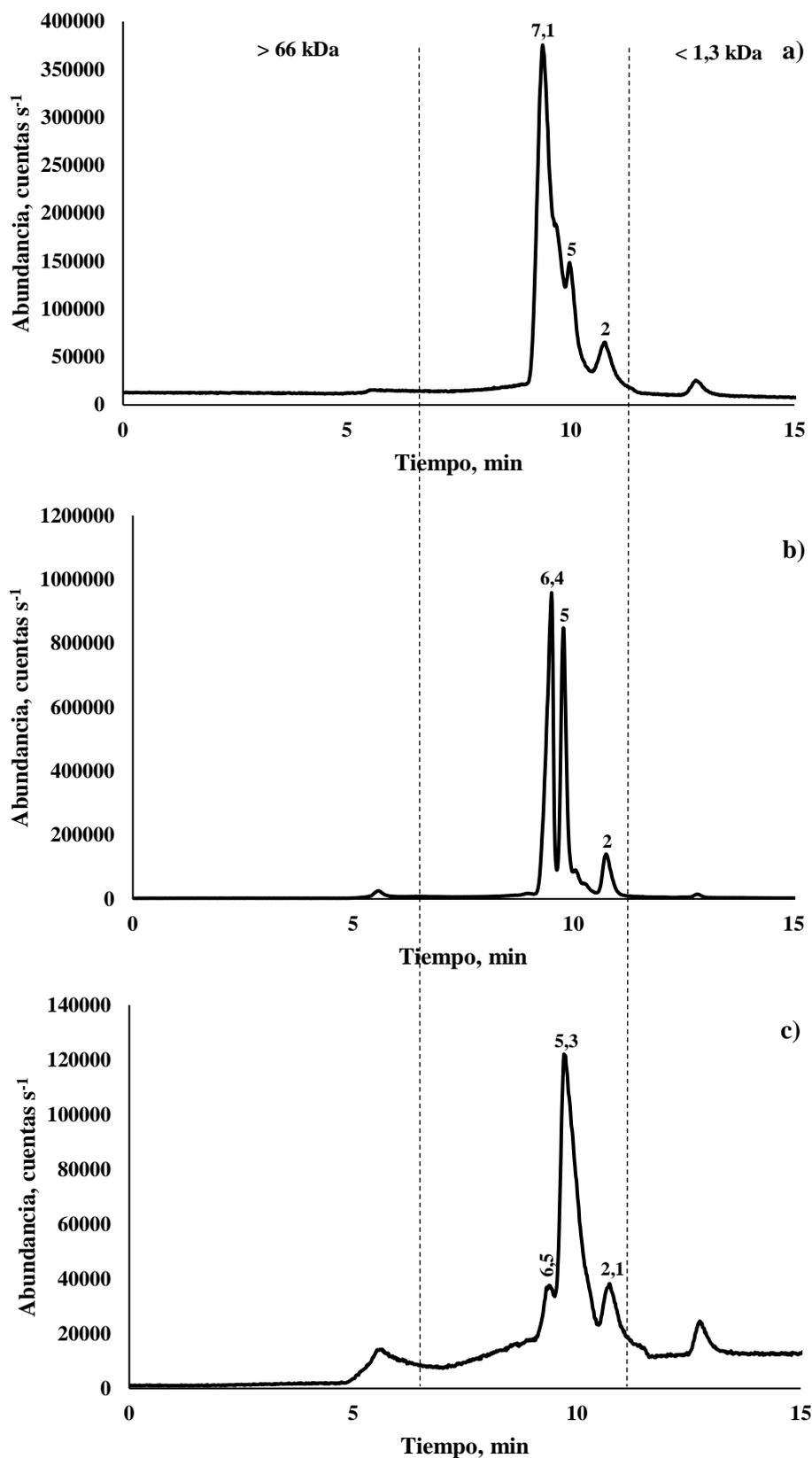


Figura 3.3.3: Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) de raíces de ajo en diferentes momentos del desarrollo de la planta. a) 4 de septiembre de 2014, b) 16 de octubre de 2014 y c) 5 de diciembre de 2014.

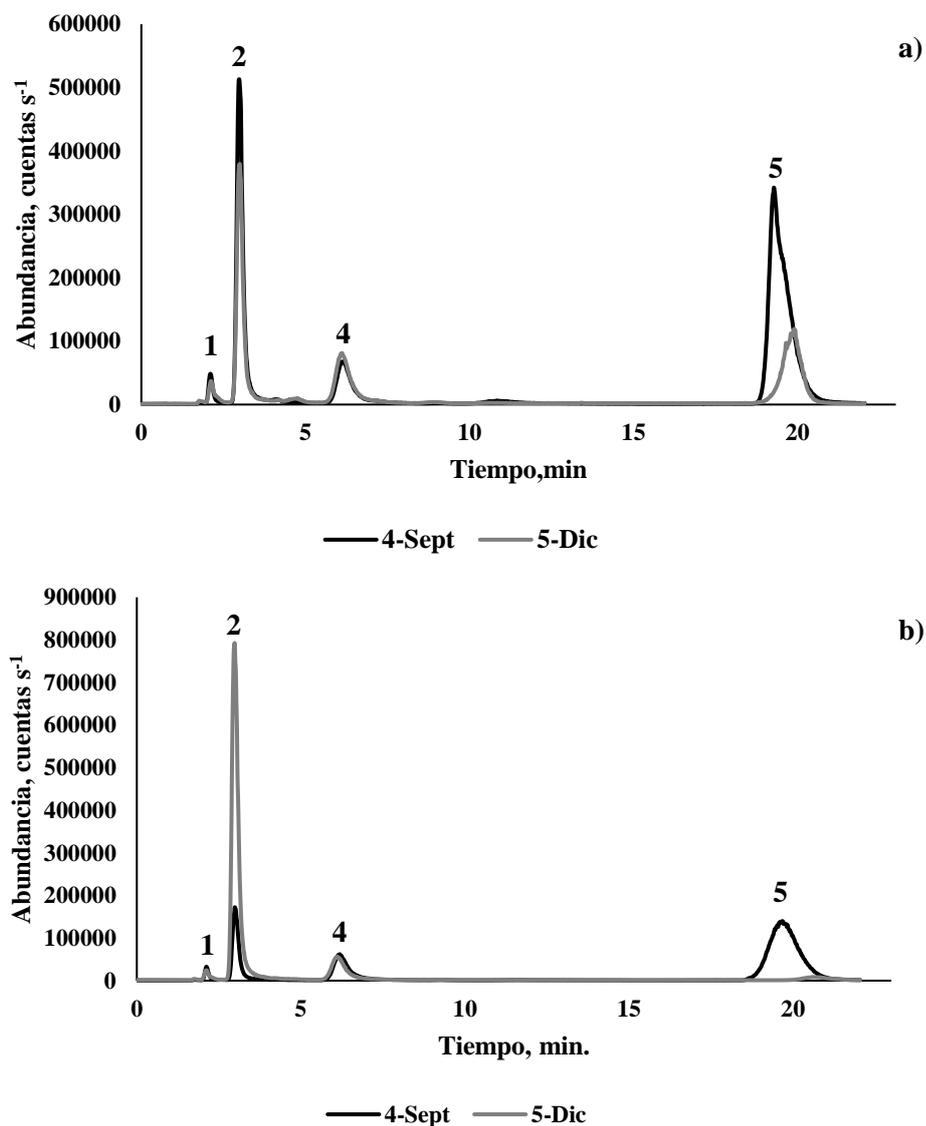
Por lo tanto, Se(IV) y Se(VI) difieren en la forma en que son acumulados y metabolizados. El Se(VI) es transportado rápidamente hacia las hojas donde se metaboliza, mientras que el Se(IV) es retenido y se metaboliza en las raíces. Es por esta razón que Se(VI) es la mejor forma de biofortificar a las plantas con Se (Li et al., 2008). Resultados similares se encontraron en otras especies biofortificadas con Se como trigo, arroz y tomates (Arvy, 1993; Asher et al., 1977; Li et al., 2010, 2008).

### **3.3.2-ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE Se EN LAS ETAPAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE AJO**

Extractos de hojas y bulbos de ajo colorado (Rubí INTA) biofortificado con Se obtenidos por hidrólisis enzimática (ver sección 2.3.5) fueron analizados por la técnica AEC-ICP-MS bajo las condiciones ya mencionadas en la Tabla 2.5.3. Las muestras pertenecían a dos momentos del desarrollo de la planta, al inicio y al final del desarrollo, donde se observó que existía una mayor variabilidad en cuanto a la especiación de Se. Un cromatograma típico obtenido después de la inyección de una mezcla de estándares de Se y de una muestra adicionada bajo las condiciones mencionadas se muestran en la Figura 3.1.5.

Diferentes especies de Se, incluyendo Se-MeSeCys, Se(VI), SeMet y una especie desconocida, se identificaron en hojas y bulbos (Fig. 3.3.4 a y b). Estos cromatogramas también revelaron que el Se se metabolizó transformándose principalmente en Se-MeSeCys. De hecho, aproximadamente el 80% del Se total encontrado en el extracto enzimático de las muestras pertenecientes a la última etapa del desarrollo de la planta estaba bajo este importante Se-aminoácido que tiene actividad anticancerígena. Como se ha explicado en secciones anteriores la razón de la presencia mayoritaria de este Se-aminoácido se debe a que plantas hiperacumuladoras como el ajo metabolizan este

elemento en aminoácidos libres y no asociados a proteínas a los efectos de evitar la toxicidad del Se (Pilon-Smits and Quinn, 2010). Resultados similares se han encontrado en otras plantas de género *Allium* y *Brassica* (Michalska-Kacymirow et al., 2014; Zhong et al., 2015). Además, otros trabajos también informaron la presencia de  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys, el cual es otro aminoácido no proteico que las plantas hiperacumuladoras también producen como mecanismo de defensa en contra de la toxicidad y que a su vez es anticancerígeno (Dumont et al., 2006; Ruszczyńska et al., 2017). En el presente trabajo, este Se-aminoácido no se observó, lo que concuerda con lo reportado en varios trabajos empleando muestras similares (Larsen et al., 2006; Ohta et al., 2011).



**Figura 3.3.4:** Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se) de bulbos y hojas de ajo colorado (Rubí INTA) en diferentes momentos del desarrollo de la planta durante la campaña 2014. a) Hojas y b) Bulbos. 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV).

En las Figuras 3.3.4 (a y b) también se puede observar que Se-MeSeCys disminuyó en las muestras de hojas, mientras que en los bulbos aumentó. Las otras especies de Se encontradas permanecieron prácticamente constantes a medida que la planta se desarrollaba. El aumento de Se-MeSeCys en los bulbos en la última etapa del desarrollo de la planta se debe a que al comenzar la etapa de bulbificación, todos aquellos metabolitos ya sintetizados en las hojas como Se-MeSeCys son transportados hacia los bulbos, y los procesos de metabolismo y acumulación se detienen (Portela and Cavagnaro, 2004). Esta habilidad de las plantas de ajo para metabolizar el Se en diferentes formas orgánicas con importantes funciones biológicas, nos habla de su gran capacidad para ser utilizadas como suplemento natural de Se en la dieta humana.

Por otro lado, muestras de raíces de ajo colorado (Rubí INTA) biofortificado con Se pertenecientes al inicio y final del desarrollo de las plantas, también fueron analizadas por AEC-ICP-MS, luego de realizada la hidrólisis enzimática de las mismas. Por razones de disponibilidad de equipamiento estas fueron analizadas bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.5.4. En la figura 3.3.5(a) se muestra un cromatograma de una mezcla de patrones de  $100 \mu\text{g}(\text{Se}) \text{L}^{-1}$  analizados bajo estas mismas condiciones.

En raíces de ajo colorado (Fig. 3.3.5 a y b) se observó la presencia de Se(VI), Se(IV), SeMet, SeCys y de una especie desconocida que podría tratarse de Se-MeSeCys según los resultados observados en hojas y bulbos (Fig. 3.3.4). La especie Se-MeSeCys no pudo ser incluida en la mezcla patrón de especies de Se debido a su falta de disponibilidad. La presencia de estos Se-aminoácidos en las raíces es consecuencia de la metabolización del Se(IV) presente en la solución de biofortificación ( $51 \text{ g Se(IV)} \text{L}^{-1}$ ), que no se trasloca hacia las hojas y es metabolizado rápidamente en las raíces (Li et al., 2008). La figura 3.3.5 también muestra como estas especies orgánicas disminuyen en el tiempo, esto se debe a que son traslocadas hacia las hojas, aunque esta traslocación es

limitada (Li et al., 2008). El Se(VI) también disminuye con el tiempo debido a que este es traslocado rápidamente hacia las hojas donde es metabolizado (Li et al., 2008). Estos resultados confirman entonces que la especie Se(VI) es la forma más eficiente para la biofortificación de plantas cuando este se incorpora al sustrato.

Por otro lado, especies de Se importantes por su poder anticancerígeno, como Se-MeSeCys, no solo se encontraron en los bulbos, sino también en hojas y raíces, por lo que estos órganos también podrían emplearse como insumo en la preparación de un potencial suplemento alimenticio de Se.

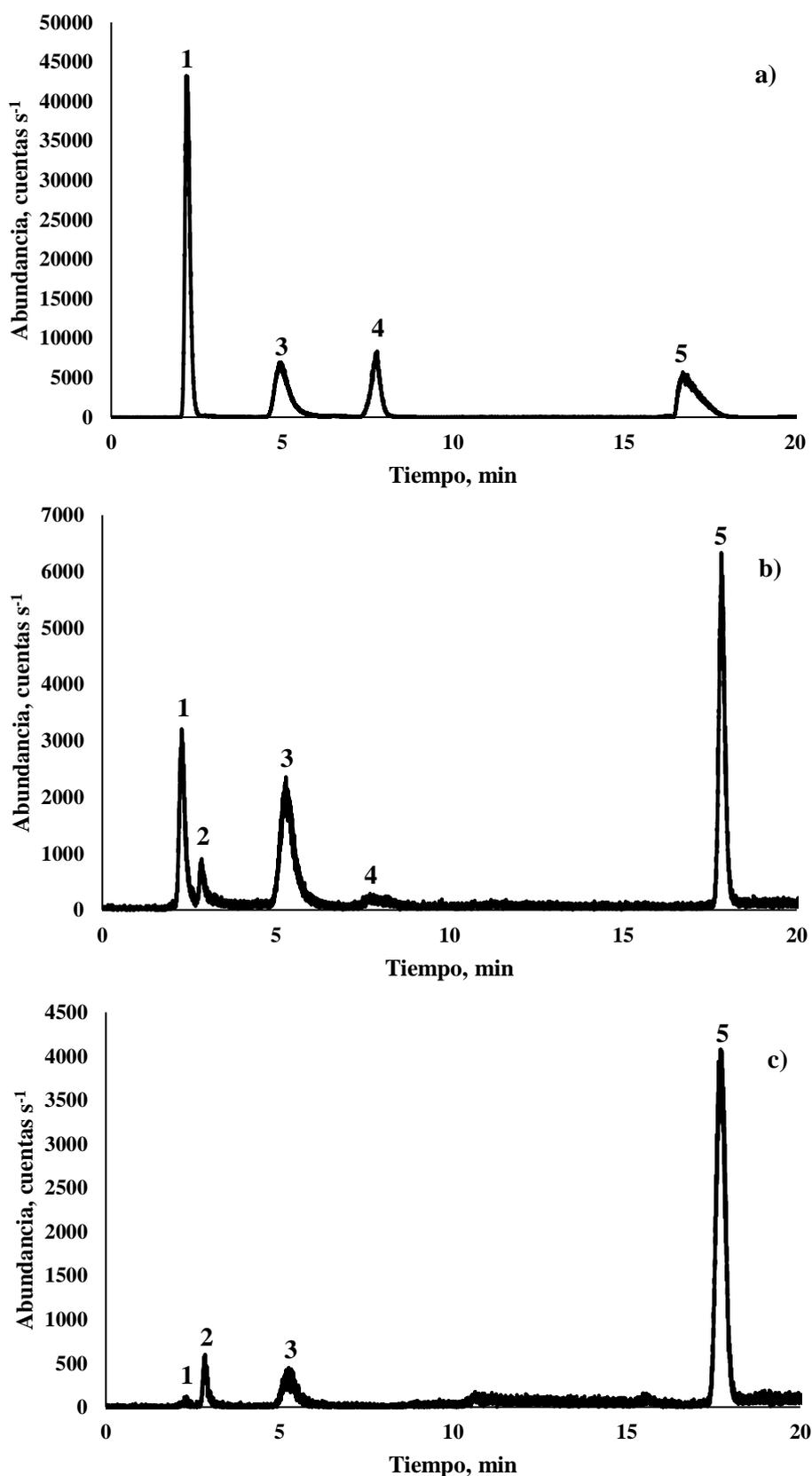
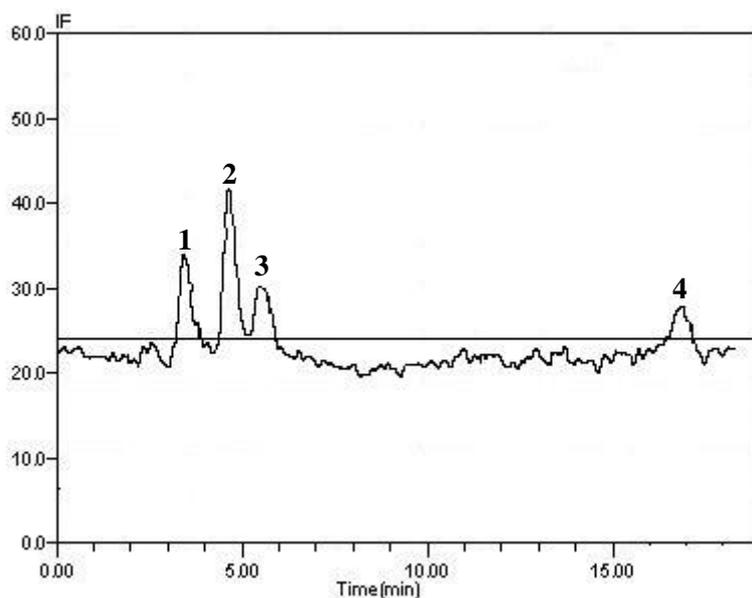


Figura 3.3.5: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS ( $^{96}\text{SeO}^+$ ) de raíces de ajo colorado (Rubí INTA) en diferentes momentos del desarrollo de la planta durante la campaña 2014. a) Mezcla de patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , b) 4 de septiembre y c) 5 de diciembre. 1) SeCys; 2) Compuesto desconocido; 3) SeMet; 4) Se(IV); 5) Se(IV).

Adicionalmente, una variedad clonal blanca (Nieve INTA) se cultivó bajo las mismas condiciones que la variedad clonal colorada (Rubí INTA) estudiada con anterioridad, de manera de realizar un estudio comparativo de la metabolización de Se y la especiación de este elemento en ambas variedades. Las condiciones del ensayo se detallan en la sección 2.2.2.3.

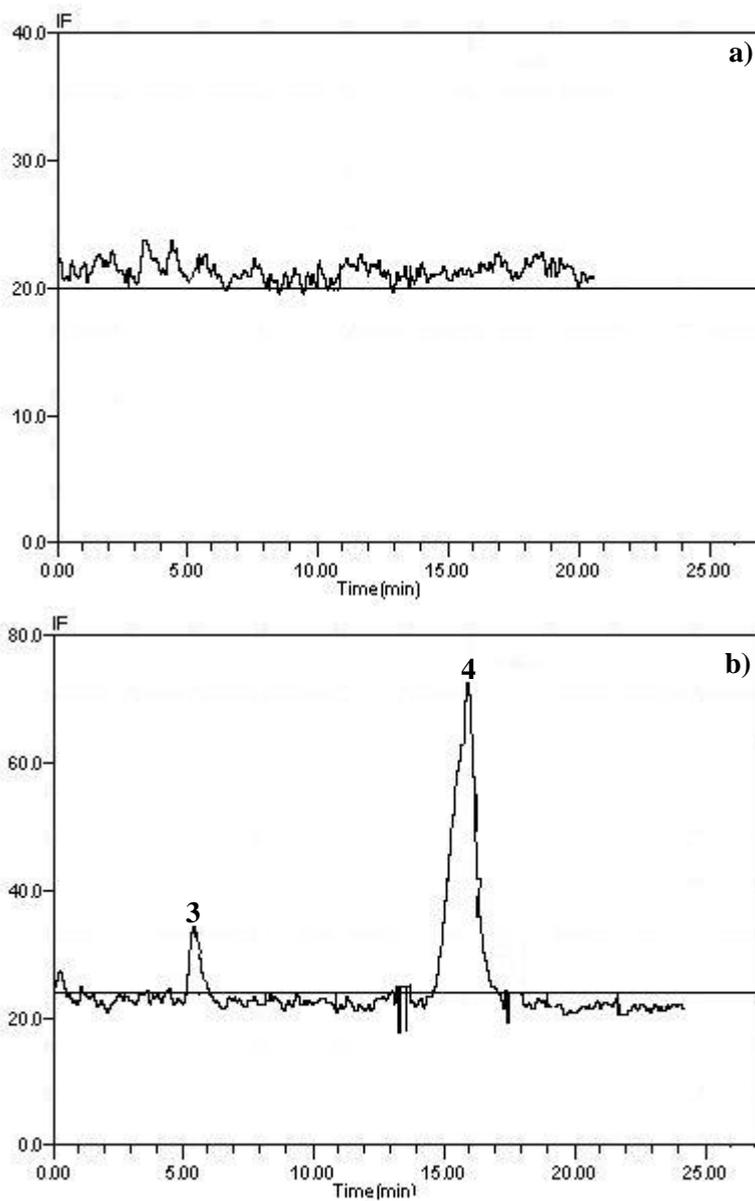
Nuevamente, las muestras de hoja, bulbo y raíz de esta variedad fueron sometidas a una hidrólisis enzimática para la extracción de las especies de Se y los extractos fueron analizados por AEC-HG-AFS bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 2.5.5. La Figura 3.3.6 muestra un cromatograma típico de una mezcla patrón de las especies de Se a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  corridos bajo las condiciones indicadas anteriormente.



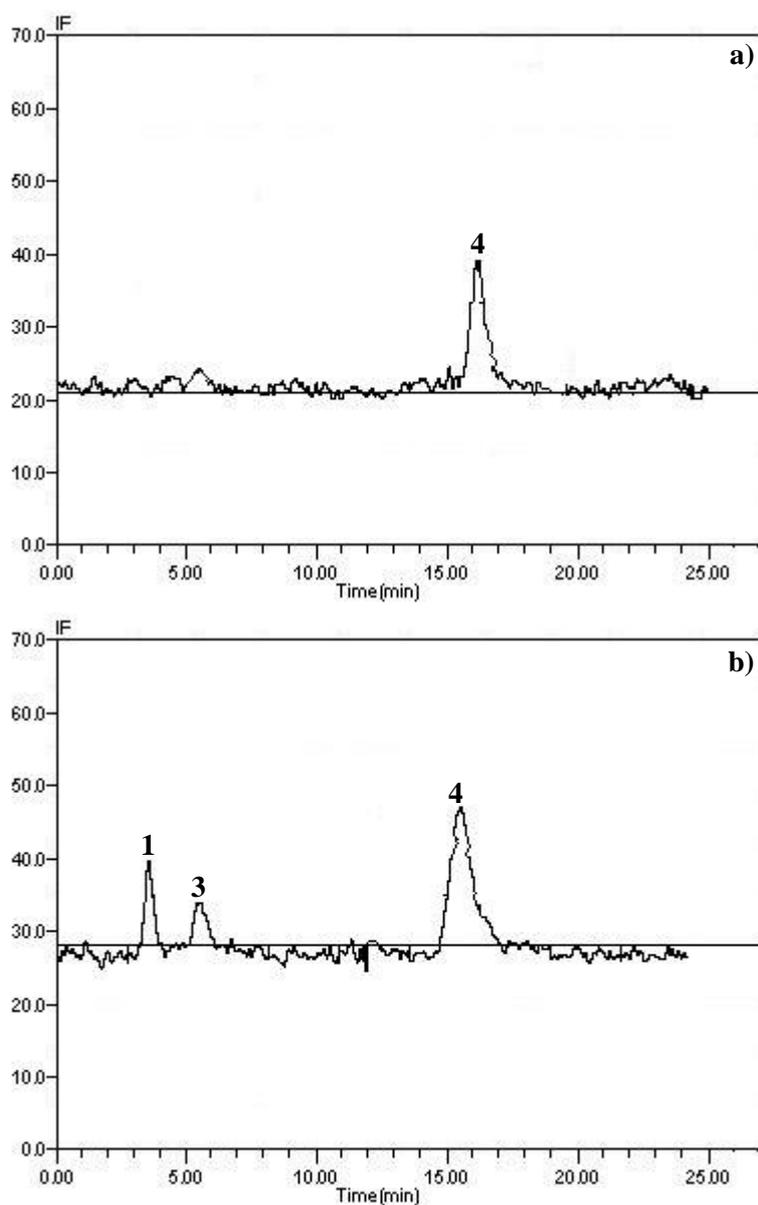
**Figura 3.3.6: Cromatogramas obtenidos por AEC-HG-AFS de una mezcla de patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . 1) Se-MeSeCys; 2) Se(IV); 3) SeMet; 4) Se(IV).**

En este caso Se-MeSeCys, SeMet y Se(VI) fueron identificados en bulbos al final del desarrollo de la planta mientras que solo SeMet y Se(VI) fueron confirmados en hojas (Fig. 3.3.7 y 3.3.8). En raíces, ninguna especie de Se pudo ser detectada durante el desarrollo de la planta. Esto puede deberse a que esta variedad clonal tiene una menor capacidad de acumular y metabolizar Se cuando este es incorporado al sustrato que la variedad clonal colorada. Resultados opuestos se encontraron cuando las plantas fueron biofortificadas vía foliar (sección 3.1) donde las variedades blancas mostraron mayor capacidad de acumular y metabolizar Se por vía foliar. Además, se encontró que cuando el Se fue incorporado por la vía foliar, el Se presente en las plantas tratadas se encontró mayoritariamente bajo la forma de Se(VI) (37-60%), mientras que cuando el Se fue adicionado al sustrato, la especie mayoritaria encontrada en las plantas fue Se-MeSeCys (80%). Debido a que las especies inorgánicas de Se son más tóxicas que las orgánicas se podría decir que la aplicación de Se en el sustrato es más conveniente que aplicar Se que la vía foliar. Resultados similares fueron reportados en arroz, en donde se demostró mayor acumulación de Se cuando el elemento se incorporó al suelo que cuando fue por la vía foliar (Boldrin et al., 2013). Por lo tanto, se puede deducir que la acumulación y metabolización de Se no solo depende de la dosis aplicada sino de otras variables, tales como la forma de aplicación, etapa del desarrollo de las plantas de ajo, naturaleza de la especie de Se utilizada y de la variedad clonal.

Además, estas diferencias en la metabolización y acumulación de Se entre variedades blancas y coloradas podría significar que existe una diversidad genética y que herramientas como el fitomejoramiento podrían emplearse para obtener nuevos cultivares con mayor capacidad de acumular y metabolizar Se (Combs, 2001; Lyons et al., 2005).



**Figura 3.3.7:** Cromatogramas obtenidos por AEC-HG-AFS en hojas de ajo blanco (Nieve INTA) en diferentes momentos de su desarrollo. a) 4 de septiembre de 2016; b) 5 de diciembre de 2016. 1) Se-MeSeCys; 2) Se(IV); 3) SeMet; 4) Se(IV).



**Figura 3.3.8:** Cromatogramas obtenidos por AEC-HG-AFS de bulbo de ajo blanco (Nieve INTA) en diferentes momentos de su desarrollo. a) 4 de septiembre de 2016; b) 5 de diciembre de 2016. 1) Se-MeSeCys; 2) Se(IV); 3) SeMet; 4) Se(IV)

### 3.3.3-BIBLIOGRAFÍA

Arvy, M.P., 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* 44, 1083–1087.

Asher, C.J., Butler, G.W., Peterson, P.J., 1977. Selenium transport in root systems of tomato. *J. Exp. Bot.* 28, 279–291.

Bhandari, P., 2012. Garlic (*Allium sativum* L.): A review of potential therapeutic applications. *Int. J. green Pharm.* 6, 118–129.

Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244.

Combs, G.F., 2001. Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.* 85, 517–547.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304–1323.

Kápolna, E., Fodor, P., 2006. Speciation analysis of selenium enriched green onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS. *Microchem. J.* 84, 56–62.

Kápolna, E., Shah, M., Caruso, J.A., Fodor, P., 2007. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chem.* 101, 1398–1406.

Larsen, E.H., Lobinski, R., Burger-Meijer, K., Hansen, M., Ruzik, R., Mazurowska, L., Rasmussen, P.H., Sloth, J.J., Scholten, O., Kik, C., 2006. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil amended with symbiotic fungi

(mycorrhiza) and selenate. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1098–1108.

Lavu, R.V.S., Du Laing, G., Van De Wiele, T., Pratti, V.L., Willekens, K., Vandecasteele, B., Tack, F., 2012. Fertilizing soil with selenium fertilizers: impact on concentration, speciation, and bioaccessibility of selenium in leek (*Allium ampeloprasum*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 10930–10935.

Li, H.-F., Lombi, E., Stroud, J.L., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., 2010. Selenium speciation in soil and rice: influence of water management and Se fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11837–11843.

Li, H., McGrath, S.P., Zhao, F., 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* 178, 92–102.

Lü, J., Zhang, J., Jiang, C., Deng, Y., Özten, N., Bosland, M.C., 2016. Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. *Nutr. Cancer* 68, 1–17.

Lyons, G., Ortiz-Monasterio, I., Stangoulis, J., Graham, R., 2005. Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant Soil* 269, 369–380.

Michalska-Kacymirow, M., Kurek, E., Smolis, A., Wierzbicka, M., Bulska, E., 2014. Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to selenium inorganic compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3717–3722.

Montes-Bayón, M., Grant, T.D., Meija, J., Caruso, J.A., 2002. Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods Plenary Lecture. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 1015–1023.

Mounicou, S., Dernovics, M., Bierla, K., Szpunar, J., 2009. A sequential

extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic. *Talanta* 77, 1877–1882.

Ohta, Y., Suzuki, N., Kobayashi, Y., Hirano, S., 2011. Rapid speciation and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS using multiple standards labelled with different isotopes. *Isotopes Environ. Health Stud.* 47, 330–340.

Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F., 2010. Selenium metabolism in plants, in: *Cell Biology of Metals and Nutrients*. Springer, pp. 225–241.

Poldma, P., Tonutare, T., Viitak, A., Luik, A., Moor, U., 2011. Effect of selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 59, 5498–5503.

Portela, J.A., Cavagnaro, J.B., 2004. Growing phases of the white garlic (*Allium sativum*) plant in relation to field temperature and day length, in: *IV International Symposium on Edible Alliaceae* 688. pp. 239–246.

Quinn, C.F., Prins, C.N., Freeman, J.L., Gross, A.M., Hantzis, L.J., Reynolds, R.J.B., Covey, P.A., Bañuelos, G.S., Pickering, I.J., Fakra, S.C., 2011. Selenium accumulation in flowers and its effects on pollination. *New Phytol.* 192, 727–737.

Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M., 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br. J. Nutr.* 100, 238–253.

Ruszczyńska, A., Konopka, A., Kurek, E., Torres Elguera, J.C., Bulska, E., 2017. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 130, 7–16.

Sharma, N., Kumar, A., Prakash, R., Prakash, N.T., 2007. Selenium accumulation and Se-induced anti-oxidant activity in *Allium cepa*. *Environ. Inform. Arch* 5, 328–336.

Tian, M., Xu, X., Liu, Y., Xie, L., Pan, S., 2016. Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. *Food Chem.* 190, 374–380.

Wróbel, K., Wróbel, K., Kannamkumarath, S.S., Caruso, J.A., Wysocka, I.A., Bulska, E., Świątek, J., Wierzbicka, M., 2004. HPLC–ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves—a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chem.* 86, 617–623.

Zhong, N., Zhong, L., Hao, L., Luan, C., Li, X., 2015. Speciation of selenium in enriched garlic sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Lett.* 48, 180–187.

### 3.4- ACUMULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ESPECIACIÓN DE Se EN VARIETADES CLONALES DE AJO CULTIVADAS EN INVERNÁCULO

Las plantas de ajo son un cultivo potencialmente útil para ser biofortificada con Se ya sea por su capacidad de acumular grandes cantidades de dicho elemento o metabolizarlo bajo la forma de Se-aminoácidos con actividad anticancerígena, como ya se expuso en las secciones anteriores. Sin embargo, resulta necesario evaluar las posibles diferencias en la acumulación y metabolización de Se entre variedades clonales debido a que dicha información es realmente escasa en el ámbito científico. En secciones anteriores se observaron diferencias en cuanto a la acumulación y metabolización de Se que no solo se debían a las dosis de Se aplicada, sino también a la variedad clonal y a la forma de biofortificación, resultando la aplicación del Se al sustrato la práctica más conveniente para alcanzar la mayor metabolización del Se en especies orgánicas del elemento.

Por lo tanto, en esta sección del trabajo de tesis se expondrán las investigaciones realizadas sobre un estudio diferencial de la acumulación, distribución y especiación de Se en cuatro variedades clonales (Nieve INTA, Unión FCA, Gostoso INTA y Rubí INTA). El Se fue incorporado al sustrato y se aplicaron dosis más altas (15, 30, 45 kg Se ha<sup>-1</sup>) que las mencionadas en la sección 3.3 a los efectos de evaluar no solo la acumulación y metabolización de Se, sino también la tolerancia de dichas variedades y la eficiencia de estas en relación al proceso de biofortificación. Para ello, el contenido de Se, el efecto de este en el peso fresco y su especiación fueron evaluados en hojas, bulbos y raíces de dos variedades clonales blancas (Nieve INTA, Unión FCA) y dos variedades clonales coloradas (Gostoso INTA, Rubi INTA). Adicionalmente, las especies de Se encontradas en las variedades ensayadas fueron identificadas por LC-ESI-MS-MS, permitiendo esto también la confirmación de las especies observadas en los ensayos descritos en secciones anteriores y complementan la identificación de las especies en base a la

comparación de tiempos de retención obtenidos entre las muestras, las muestras sobregregadas con las especies de Se y los patrones de Se analizados.

### **3.4.1-ACUMULACIÓN DE Se EN DIFERENTES VARIEDADES CLONALES DE AJO**

La concentración de Se en diferentes órganos (hojas, bulbos y raíces) de cuatro variedades clonales de ajos tratados con dosis crecientes de Se (0, 15, 30 y 45 kg Se ha<sup>-1</sup>) se muestra en la Figura 3.4.1. Las cuatro variedades clonales ensayadas mostraron habilidad para acumular grandes cantidades de Se, sin embargo, las variedades coloradas mostraron mayor capacidad de acumulación que las variedades blancas cuando el Se fue incorporado al sustrato de las macetas de crecimiento, confirmando así lo expuesto en la sección 3.3. De este modo, las variedades coloradas representan la opción más eficiente en cuanto a la biofortificación con Se.

Es importante mencionar que existen trabajos previamente reportados acerca de la acumulación de Se en otras especies tales como arroz, brócoli y algunas gramíneas (Bañuelos et al., 2003; Wu and Huang, 1991; Zhang et al., 2006). Esto es de gran importancia desde el punto de vista del fitomejoramiento donde se podría utilizar esta variabilidad genética para obtener cultivares más aptos para la biofortificación. Sin embargo, en especies como el trigo se ha reportado que no existe variabilidad genética en la acumulación de Se si no que esta depende solamente de la dosis y forma de Se aplicada, por lo que el mejoramiento genético no siempre es una opción en la biofortificación con Se (Lyons et al., 2005). En estos casos, herramientas como la biotecnología con el desarrollo de transgénicos o la ingeniería metabólica se podría implementar como complemento de la biofortificación agronómica (García-Bañuelos et al., 2011).

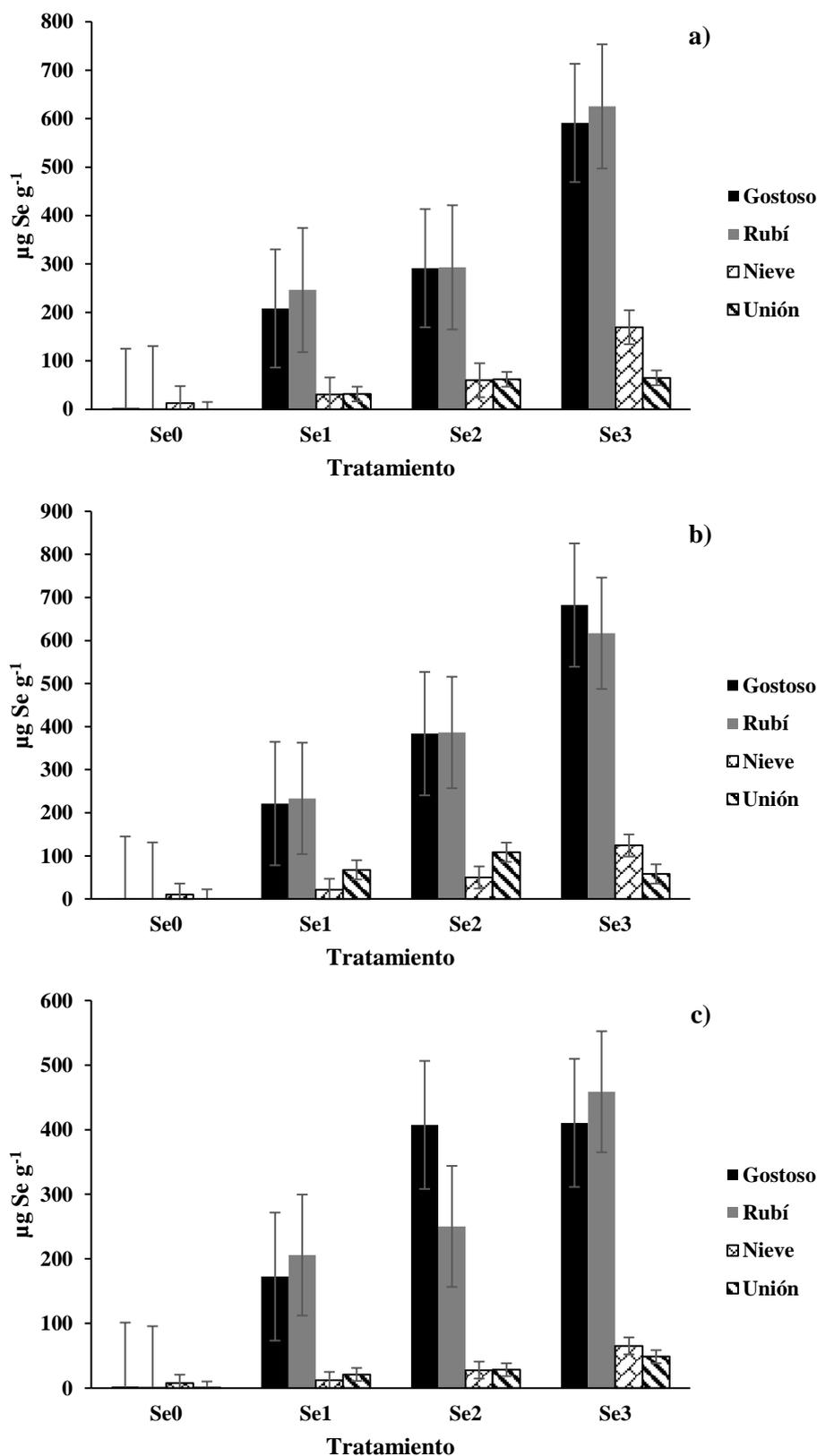


Figura 3.4.1: Concentración de Se en cuatro variedades clonales de ajo tratadas con dosis crecientes de Se. a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se1: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se2: 30 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se3: 45 kg Se ha<sup>-1</sup>. Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas

Por otro lado, la Figura 3.4.1 también permite apreciar que los órganos de plantas de ajo tratadas con Se, acumulan una mayor cantidad de este elemento cuanto más alta es la dosis aplicada. Esto ha sido reportado en una gran cantidad de especies pertenecientes a los géneros *Allium* y *Brassica* que son consideradas hiperacumuladoras de Se (Arscott and Goldman, 2012; Lavu et al., 2012; Reilly et al., 2014). Los resultados expuestos a este punto permitieron confirmar que la acumulación de Se en ajos depende de la dosis aplicada y de la variedad.

### **3.4.2-EFECTO DEL Se SOBRE EL PESO FRESCO OBTENIDO DE LAS DIFERENTES VARIEDADES CLONALES DE AJO**

El efecto del Se sobre el peso fresco en órganos de diferentes variedades clonales de ajo se muestra en la Figura 3.4.2. Como se puede observar, el peso fresco no se vio afectado significativamente cuando las plantas fueron tratadas con las dosis más bajas de Se ensayadas (15 y 30 kg Se ha<sup>-1</sup>), aunque por otro lado la dosis más alta (45 kg Se ha<sup>-1</sup>) sí afectó el peso fresco de los órganos de las cuatro variedades clonales. El efecto observado fue negativo dado que el peso fresco disminuyó y esto podría deberse a los efectos tóxicos causados por el Se cuando la planta es tratada con dosis muy elevadas. El Se causa toxicidad debido a dos mecanismos propuestos, uno de los cuales relacionado a proteínas cuyas estructuras no están bien constituidas y otro al inducir estrés oxidativo (Gupta and Gupta, 2017). Las proteínas malformadas se forman debido a la incorporación errónea de SeCys y SeMet en lugar de Cys y Met en la cadena proteica, modificando la estructura y función de proteínas esenciales para las plantas (Gupta and Gupta, 2017). Por otro lado, el Se en altas dosis actúa como prooxidante y genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo en las plantas, siendo esto altamente dañino para las mismas (Gupta and Gupta, 2017). El efecto tóxico del Se ha sido reportado en varias especies como girasol, pepino y trigo donde la disminución del peso fresco fue

proporcional a la dosis aplicada (Garousi et al., 2016; Haghghi et al., 2016; Łabanowska et al., 2012).

En las investigaciones realizadas en la presente tesis doctoral, si bien el ajo demostró poseer una alta tolerancia al Se cuando sus concentraciones fueron muy altas, este elemento presenta como un aspecto negativo la elevada toxicidad que posee a altas concentraciones, por lo tanto, según los resultados obtenidos, la dosis óptima de Se a utilizar para biofortificar los cultivos de ajo debería encontrarse por debajo de los 45 kg Se ha<sup>-1</sup>.

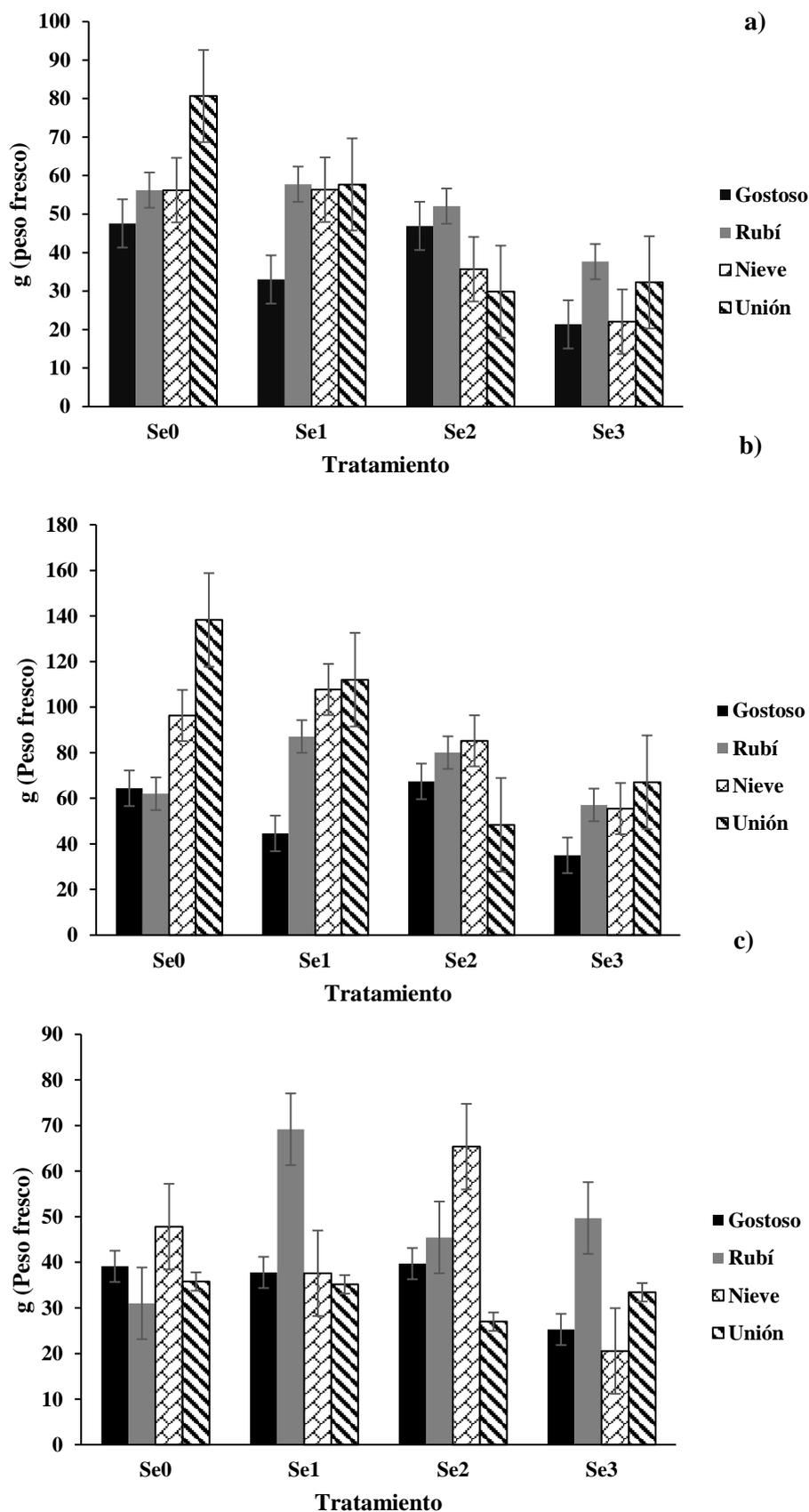


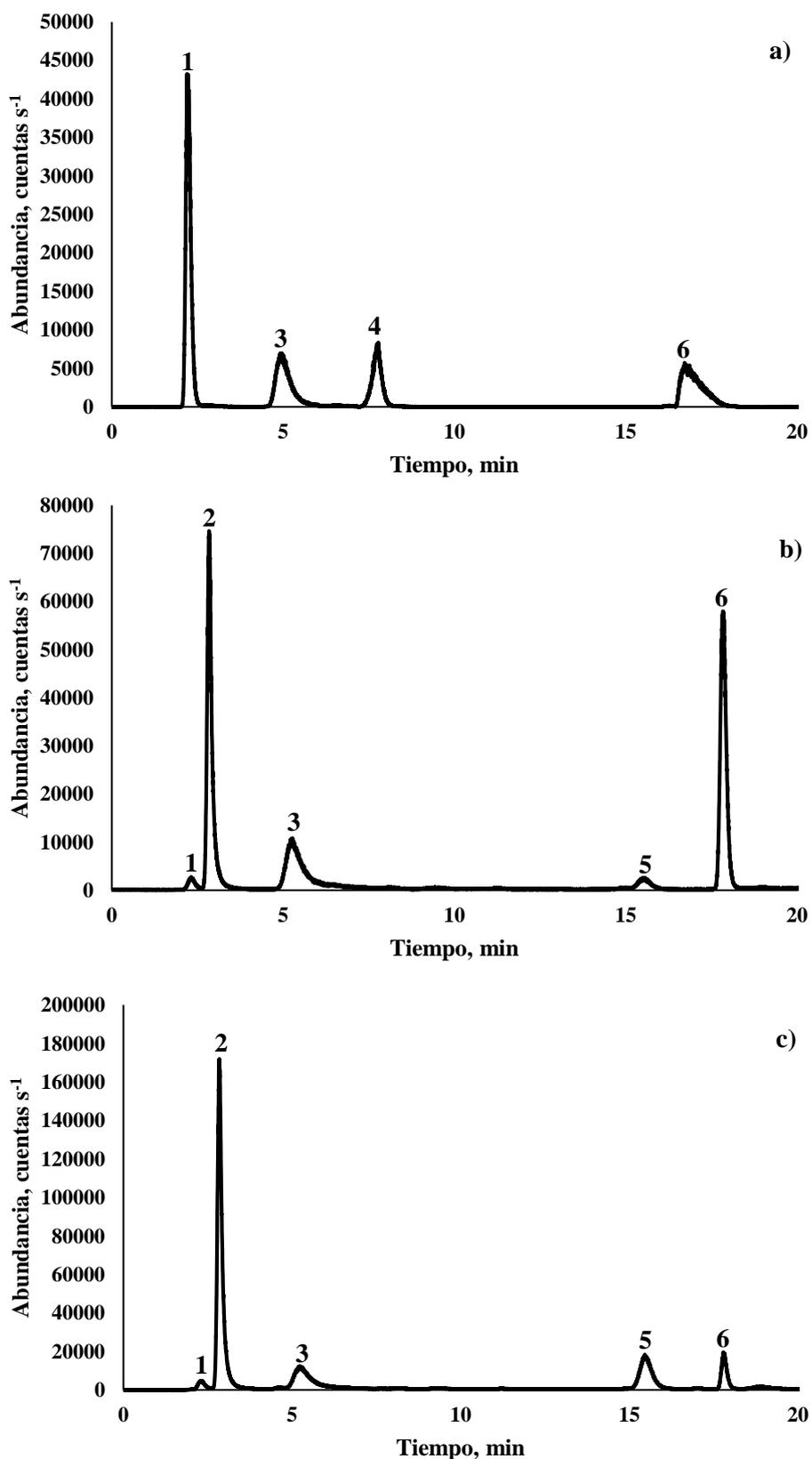
Figura 3.4.2: Peso fresco (g) de cuatro variedades clonales de ajo tratadas con dosis crecientes de Se. a) Hojas, b) Bulbo y c) Raíces. Se0: 0 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se1: 15 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se2: 30 kg Se ha<sup>-1</sup>. Se3: 45 kg Se ha<sup>-1</sup>. <sup>a</sup>Las medias son el resultado de tres determinaciones y tres réplicas

### 3.4.3-ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE Se EN DIFERENTES VARIEDADES CLONALES DE AJO DE INVERNÁCULO

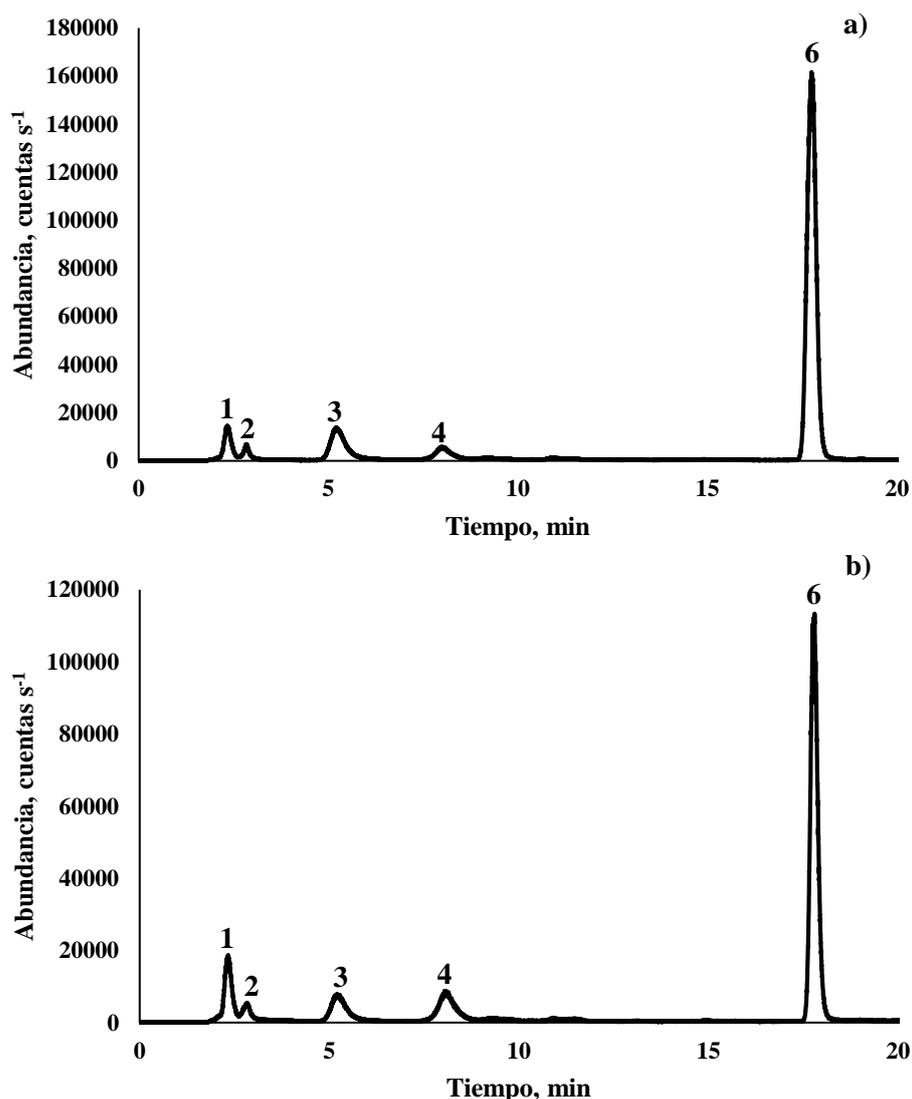
En experimentos previos presentados en las secciones anteriores, no se encontraron diferencias en cuanto a la especiación de Se dentro de un mismo tipo comercial de ajo para el análisis de especiación por AEC-ICP-MS. Por lo tanto, se planteó una investigación comparativa para determinar si la especiación de Se podría mostrar una dependencia con las diferentes variedades clonales de ajo. Para dicho ensayo, se seleccionaron ajos de una variedad clonal blanca (Nieve INTA) y una variedad clonal colorada (Rubi INTA) que presentaron las concentraciones más elevadas de Se. Así, las muestras de hojas, bulbos y raíces con las concentraciones más elevadas de Se fueron analizadas por la técnica AEC-ICP-MS y bajo las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 2.5.4. El protocolo de extracción de las especies de Se incluyó la hidrólisis enzimática descrita 2.3.5 como etapa previa a la determinación analítica. En la Figura 3.4.3(a) se muestra el cromatograma de una mezcla de patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  obtenido bajo las condiciones indicadas en dicha tabla.

Diferentes especies de Se, incluyendo SeMet, SeCys, Se(VI) y un compuesto que pudo ser identificado por coincidencia de tiempos de retención con la mezcla patrón de especies de Se, se hallaron presentes en los extractos de hojas, bulbos y raíces (Fig. 3.4.3 b y c; 3.4.4 y 3.4.5). Dicho compuesto desconocido podría tratarse de Se-MeSeCys como fue reportado en la sección 3.3, él no fue posible incluir en la mezcla patrón de especies de Se debido a su falta de disponibilidad. La Se(IV) solo fue detectada en hojas (Fig. 3.4.4) y otro compuesto desconocido fue detectado únicamente en bulbos (Fig. 3.4.3 a y b). Al respecto de la presencia de los compuestos desconocidos mencionados, y según lo reportado en otros trabajos, cabe destacar que este compuesto podría tratarse de  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys, él también se ha hallado presente en ajos cultivados pero bajo condiciones

diferentes a las mencionadas en el presente trabajo de tesis (Mounicou et al., 2009; Ruszczynska et al., 2017). En este sentido, cabe recordar lo mencionado previamente, respecto de la dependencia que existe entre la naturaleza de las especies de Se sintetizadas por el ajo y sus condiciones de cultivo, entre otros parámetros. También, es importante destacar que si bien no se encontraron diferencias significativas en la especiación de Se en las cuatro variedades clonales ensayadas, el ajo demuestra que en cualquiera de sus variedades posee una gran habilidad para metabolizar Se y formar mayoritariamente compuestos orgánicos que se ha demostrado pueden ser potencialmente beneficiosos para la salud. Resultados similares se han reportados para varias plantas del género *Allium*, donde los compuestos mayoritarios encontrados correspondieron a la especies tales como Se-MeSeCys y  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys (Kápolna et al., 2007; Ogra et al., 2015; Whanger et al., 2000; Zhong et al., 2015).



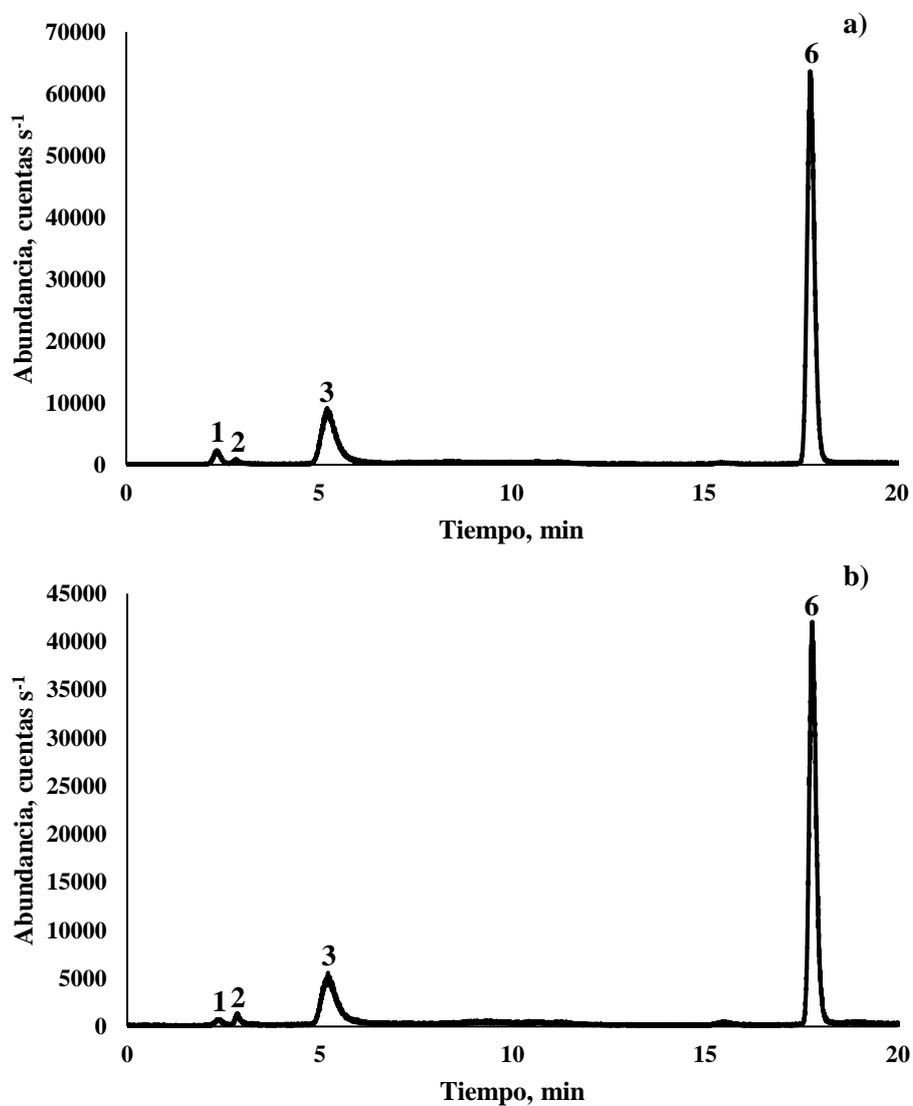
**Figura 3.4.3: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>76</sup>SeO<sup>+</sup>) de bulbos de ajos tratados con Se. a) Mezcla de patrones de 100 μg L<sup>-1</sup>, b) Variedad clonal blanca (Nieve INTA) y c) Variedad clonal colorada (Rubí INTA). 1) SeCys; 2) Compuesto desconocido 1; 3) SeMet; 4) Se(IV); 5) Compuesto desconocido 3; 6) Se(IV).**



**Figura 3.4.4:** Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS ( $^{76}\text{SeO}^+$ ) de hojas de ajos tratados con Se. a) Variedad clonal blanca (Nieve INTA) y b) Variedad clonal colorada (Rubí INTA). 1) SeCys; 2) Compuesto desconocido 1; 3) SeMet; 4) Se(IV); 5) Compuesto desconocido 3; 6) Se (IV).

Otro aspecto interesante que surgió de la observación de los cromatogramas, es que las variedades coloradas tienden a traslocar desde las hojas hacia el bulbo una proporción mayor de compuestos orgánicos que las variedades blancas (Fig. 3.4.3 b y c). Esto podría indicar entonces que las variedades coloradas son más convenientes para la biofortificación con Se dado que las especies orgánicas de Se poseen beneficios para la salud con respecto a las inorgánicas que resultan tóxicas en concentraciones elevadas.

Los resultados obtenidos en los experimentos mencionados se encuentran así en concordancia con lo expuesto en la sección 3.2 y 3.3.



**Figura 3.4.5:** Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>76</sup>SeO<sup>+</sup>) de raíces de ajos tratados con Se. a) Variedad clonal blanca (Nieve INTA) y b) Variedad clonal colorada (Rubí INTA). 1) SeCys; 2) Compuesto desconocido 1; 3) SeMet; 4) Se(IV); 5) Compuesto desconocido 3; 6) Se(IV).

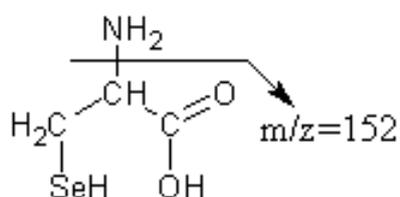
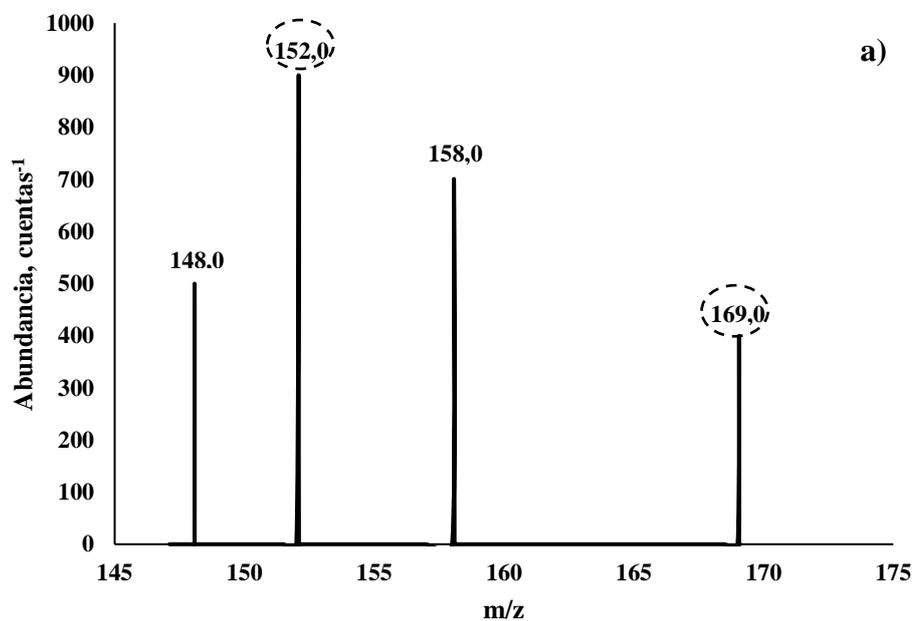
### 3.4.4-CARACTERIZACIÓN DE Se AMINOÁCIDOS POR LC-ESI-MS-MS

Con el objeto de identificar las especies de Se desconocidas que fueron detectadas en las diferentes plantas de ajo tratadas con Se, además de confirmar la presencia de aquellas especies identificadas en base a los tiempos de retención observados en los diferentes cromatogramas, se colectaron 20 veces las fracciones de los picos correspondientes a dichas especies y después se preconcentraron con una centrífuga al vacío hasta sequedad. Posteriormente, la fracciones secas fueron resuspendidas en 23  $\mu$ l de solución acuosa al 2% (v/v) de ácido fórmico y la solución resultante se inyectó en un equipo ESI-QTOF para la obtención de los espectros MS/MS necesarios para la correcta caracterización de las especies de Se.

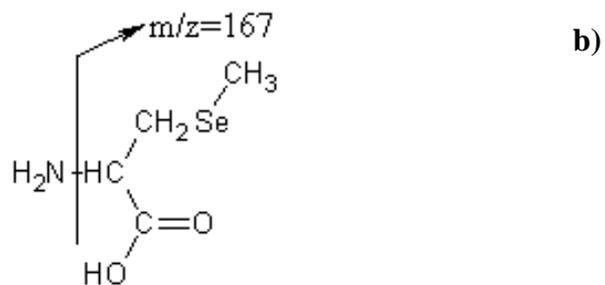
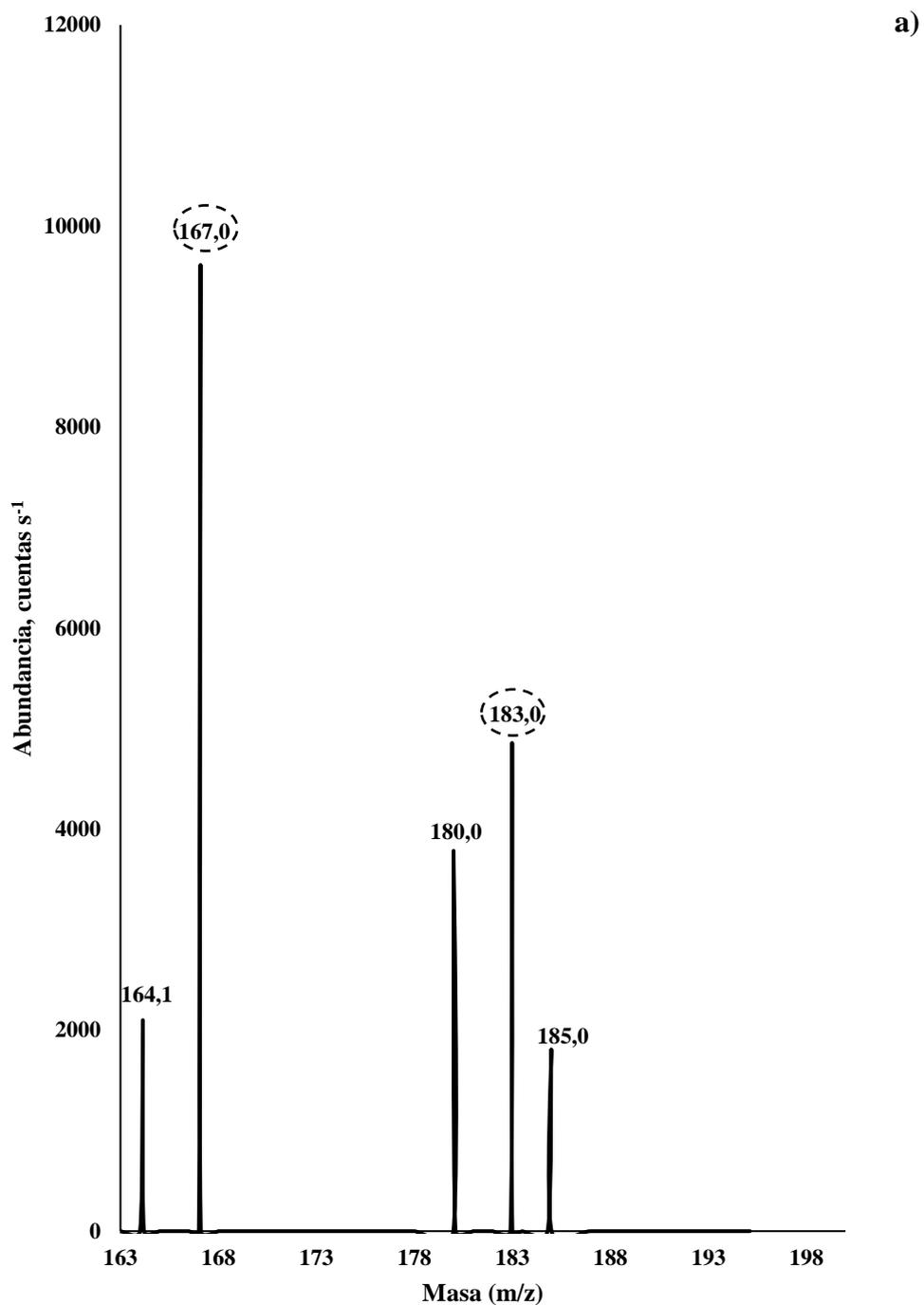
El pico nro. 1 había sido identificado según su tiempo de retención ( $t_r = 2,5$  min) como la especie SeCys en todas las muestras analizadas por AEC (Fig. 3.4.3-5). Para confirmar dicho resultado, el análisis del espectro MS/MS de la solución inyectada correspondiente al pico nro. 1 se puede observar en la Figura 3.4.6 (a), en donde se expone el ion molecular con relación  $m/z = 169$   $[M+H^+]$ . La fragmentación obtenida es consistente a la reportada para SeCys (Figura 3.4.6 (b)), donde se observa un fragmento típico  $m/z = 152$  debido a la pérdida característica del grupo amino (Gosetti et al., 2007).

El pico nro. 2 ( $t_r = 2,8$  min) no pudo ser identificado en base a la coincidencia de tiempos de retención con ninguna de las especies de Se presentes en la mezcla patrón inyectada en AEC-ICP-MS (Fig. 3.4.3-5). Por lo tanto, este pico también fue colectado y analizado por ESI-QTOF. El espectro de masas obtenido para dicho pico se muestra en la Figura 3.4.7 (a). En este caso, los fragmentos obtenidos en los espectros corresponden a un ion molecular de  $m/z = 183$  correspondiente a la especie Se-MeSeCys. La fragmentación de dicha molécula se muestra en la Figura 3.4.7 (b). Este resultado guarda

relación con lo reportado previamente por otros autores observándose un fragmento típico de  $m/z=167$  (Gosetti et al., 2007; Ruszczyńska et al., 2017; Shao et al., 2014).



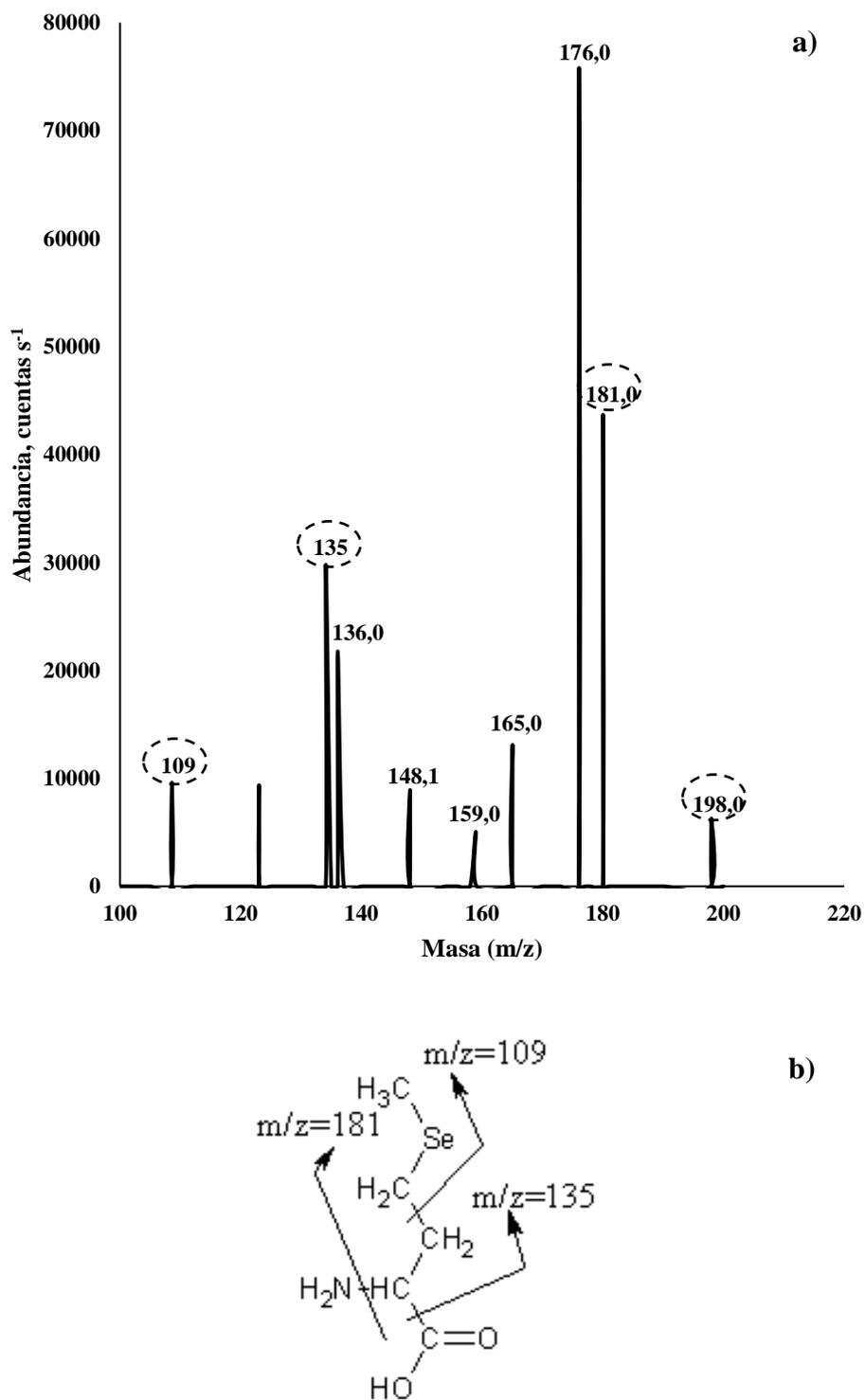
**Figura 3.4.6: Identificación de SeCys por LC-ESI-MS/ MS.** a) Espectro de masas de la fragmentación del ión molecular  $m/z = 169 [M + H^+]$ . b) Fragmentación de la molécula de SeCys.



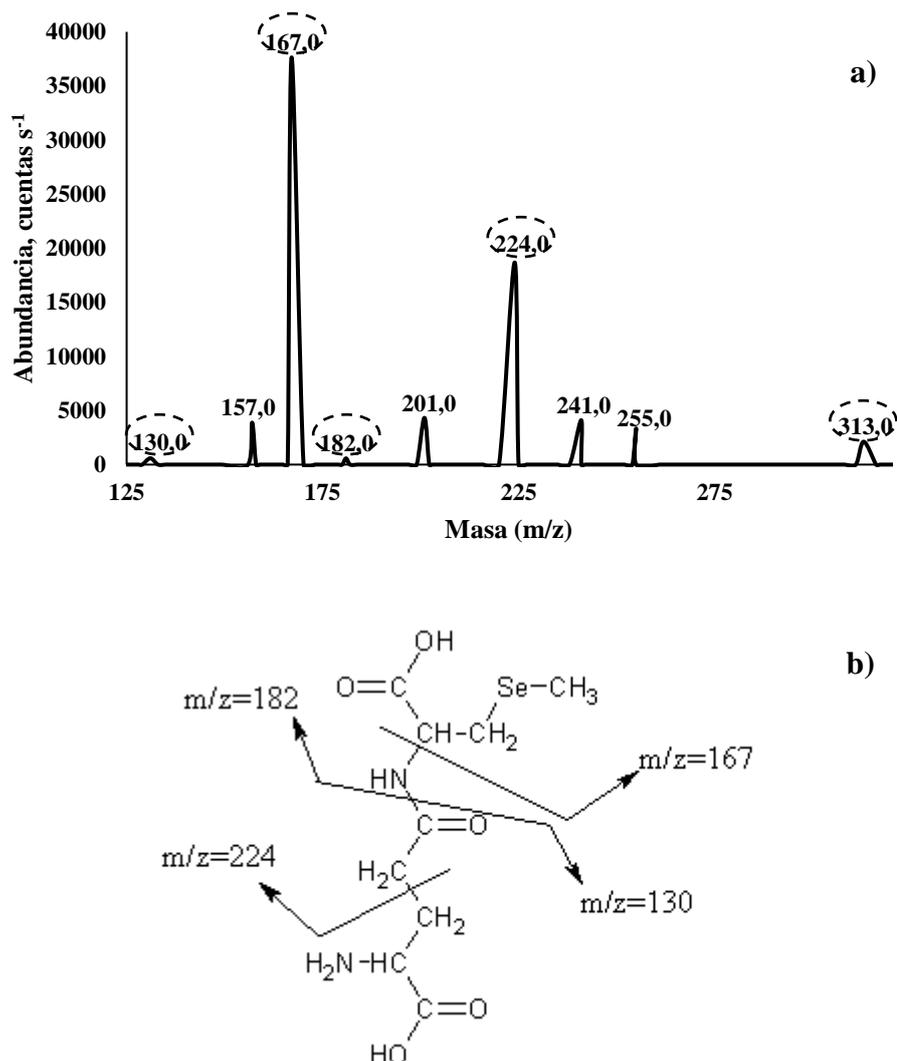
**Figura 3.4.7: Identificación de Se-MeSeCys por LC-ESI-MS/MS.** a) Espectro de masas de la fragmentación del ión molecular  $m/z = 183$   $[M + H^+]$ . b) Fragmentación de la molécula de Se-MeSeCys

Por otro lado, SeMet pudo identificarse en base a la coincidencia de tiempos de retención ( $t_r=5,3$ ) con uno de los picos observados en el cromatograma de la mezcla patrón de las especies de Se y luego del análisis por AEC-ICP-MS (Fig. 3.4.3-5). Sin embargo, a los efectos de confirmar la identificación de SeMet, también se colectó el pico correspondiente a dicha especie y se analizó por ESI-QTOF. El espectro de masas obtenido para esta fracción colectada se muestra en la figura 3.4.8 (a). Este espectro pertenece a un ion molecular de  $m/z=198$  y su fragmentación coincide a la reportada para SeMet (Gosetti et al., 2007; Huerta et al., 2003; Ruszczyńska et al., 2017). La molécula fragmentada se muestra en la figura 3.4.8 (b).

Finalmente, fracciones del pico nro. 5 ( $t_r=15,6$  min), también fueron colectadas y analizadas por ESI-QTOF dado que tampoco pudo ser identificado en base a la coincidencia de tiempos de retención con ninguna de las especies de Se presentes en la mezcla patrón inyectada en AEC-ICP-MS (Fig. 3.4.3-5). El espectro de masas de la solución inyectada se muestra en la Figura 3.4.9 (a). Como puede observarse en la Figura 3.4.9 (b) los fragmentos obtenidos para el ion molecular  $m/z = 313 [M+H^+]$  coincide con lo que se podría esperar para la especie  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys. La fragmentación obtenida coincide a la reportada por varios autores (Ruszczyńska et al., 2017; Shah et al., 2004).



**Figura 3.4.8: Identificación de SeMet por LC-ESI-MS/MS.** a) Espectro de masas de la fragmentación del ión molecular  $m/z = 198 [M + H^+]$ . b) Fragmentación de la molécula de SeMet.



**Figura 3.4.9: Identificación de  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys por LC-ESI-MS/MS.** a) Espectro de masas de la fragmentación del ion molecular  $m/z = 313$   $[M + H^+]$ . b) Fragmentación de la molécula de  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys.

Por lo que Se-aminoácidos como SeMet, SeCys, Se-MeSeCys y  $\gamma$ -Glu-Se-MeSeCys conocidos por su poder anticancerígeno fueron caracterizados e identificados en las plantas de ajo analizadas (Battin et al., 2011). Finalmente, la presencia de las especies orgánicas mencionadas en los ajos fortificados con Se, permite establecer que el ajo es un alimento natural capaz de aportar compuestos de gran importancia nutricional y ser una fuente principal de Se en la dieta humana.

**3.4.5-BIBLIOGRAFÍA**

Arcscott, S., Goldman, I., 2012. Biomass effects and selenium accumulation in sprouts of three vegetable species grown in selenium-enriched conditions. *HortScience* 47, 497–502.

Bañuelos, G.S., Pasakdee, S., Finley, J.W., 2003. Growth response and selenium and boron distribution in broccoli varieties irrigated with poor quality water. *J. Plant Nutr.* 26, 2537–2549.

Battin, E.E., Zimmerman, M.T., Ramoutar, R.R., Quarles, C.E., Brumaghim, J.L., 2011. Preventing metal-mediated oxidative DNA damage with selenium compounds. *Metallomics* 3, 503–512.

Garcia-Banuelos, M.L., A Hermosillo-Cereceres, M., Sánchez, E., 2011. The importance of selenium biofortification in food crops. *Curr. Nutr. Food Sci.* 7, 181–190.

Garousi, F., Kovács, B., Andrási, D., Veres, S., 2016. Selenium Phytoaccumulation by Sunflower Plants under Hydroponic Conditions. *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 382.

Gosetti, F., Frascarolo, P., Polati, S., Medana, C., Gianotti, V., Palma, P., Aigotti, R., Baiocchi, C., Gennaro, M.C., 2007. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC–MS/MS methods. *Food Chem.* 105, 1738–1747.

Gupta, M., Gupta, S., 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front. Plant Sci.* 7, 2074.

Haghighi, M., Sheibanirad, A., Pessarakli, M., 2016. Effects of selenium as a beneficial element on growth and photosynthetic attributes of greenhouse cucumber. *J. Plant Nutr.* 39, 1493–1498.

Huerta, V.D., Szpunar, J., Lobinski, R., Sánchez, M.L.F., Sanz-Medel, A., 2003. Sample preparation for identification of selenocompounds in urine by electrospray-MS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 1471–1476.

Kápolna, E., Shah, M., Caruso, J.A., Fodor, P., 2007. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chem.* 101, 1398–1406.

Łabanowska, M., Filek, M., Kościelniak, J., Kurdziel, M., Kuliś, E., Hartikainen, H., 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings—EPR, enzymatic and fluorescence studies. *J. Plant Physiol.* 169, 275–284.

Lavu, R.V.S., Du Laing, G., Van De Wiele, T., Pratti, V.L., Willekens, K., Vandecasteele, B., Tack, F., 2012. Fertilizing soil with selenium fertilizers: impact on concentration, speciation, and bioaccessibility of selenium in leek (*Allium ampeloprasum*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 10930–10935.

Lyons, G., Ortiz-Monasterio, I., Stangoulis, J., Graham, R., 2005. Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant Soil* 269, 369–380.

Mounicou, S., Dernovics, M., Bierla, K., Szpunar, J., 2009. A sequential extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic. *Talanta* 77, 1877–1882.

Ogra, Y., Awaya, Y., Anan, Y., 2015. Comparison of accumulation of four metalloids in *Allium sativum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 604–608.

Reilly, K., Valverde, J., Finn, L., Gaffney, M., Rai, D.K., Brunton, N., 2014. A note on the effectiveness of selenium supplementation of Irish-grown *Allium* crops. *Irish*

J. Agric. Food Res. 53, 91–99.

Ruszczyńska, A., Konopka, A., Kurek, E., Torres Elguera, J.C., Bulska, E., 2017. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 130, 7–16.

Shah, M., Kannamkumarath, S.S., Wuilloud, J.C.A., Wuilloud, R.G., Caruso, J.A., 2004. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 381–386.

Shao, S., Mi, X., Ouerdane, L., Lobinski, R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., Vass, A., Dernovics, M., 2014. Quantification of Se-methylselenocysteine and its  $\gamma$ -glutamyl derivative from naturally Se-enriched green bean (*Phaseolus vulgaris vulgaris*) after HPLC-ESI-TOF-MS and orbitrap MS n-based identification. *Food Anal. Methods* 7, 1147–1157.

Whanger, P.D., Ip, C., Polan, C.E., Uden, P.C., Welbaum, G., 2000. Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps (*Allium tricoccum*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 5723–5730.

Wu, L., Huang, Z.-Z., 1991. Selenium tolerance, salt tolerance, and selenium accumulation in tall fescue lines. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 47–56.

Zhang, L., Shi, W., Wang, X., Zhou, X., 2006. Genotypic differences in selenium accumulation in rice seedlings at early growth stage and analysis of dominant factors influencing selenium content in rice seeds. *J. Plant Nutr.* 29, 1601–1618.

Zhong, N., Zhong, L., Hao, L., Luan, C., Li, X., 2015. Speciation of selenium in enriched garlic sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with

inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Lett.* 48, 180–187.

### 3.5- EFECTO DE MÉTODOS TRADICIONALES DE COCCIÓN SOBRE EL CONTENIDO Y ESPECIACIÓN DE Se EN AJO

El ajo, un condimento de cocina doméstico ampliamente utilizado, puede sintetizar naturalmente varios compuestos de S, pero también y como ya ha quedado demostrado en el presente trabajo de tesis doctoral, es capaz de sintetizar Se-aminoácidos como producto de la metabolización del Se incorporado en la planta (El-Bayoumy et al., 2006). Entre estos Se-aminoácidos se encuentran Se-MeSeCys, SeCys y SeMet que tienen incluso mayor actividad antioxidante que sus análogos de S (Battin et al., 2011). De esta manera, puede considerarse que el ajo enriquecido con Se combina los beneficios de dicho elemento, con los propios del ajo y que son reconocidos desde la antigüedad de la civilización humana. De hecho, hay informes que demuestran la alta biodisponibilidad que tiene el Se en el ajo enriquecido (Ip and Lisk, 1993; Thiry et al., 2012). Esta alta biodisponibilidad se debe fundamentalmente a la presencia de SeMet y otras especies de Se que también son precursoras del metilselenol, un importante anticancerígeno en animales y humanos (Thiry et al., 2012). Sin embargo, cuando el ajo es sometido a diferentes métodos de cocción previo a su consumo, dichos métodos pueden modificar componentes químicos de interés. De hecho, diferentes investigaciones han revelado que estos tratamientos podrían ocasionar cambios significativos en los alimentos que involucran la modificación de sus características físicas y químicas (por ejemplo, desnaturalización de proteínas, color y sabor, entre otros) (Shabbir et al., 2015). También se ha demostrado que algunos métodos de cocción son capaces de preservar la actividad antioxidante de ciertos vegetales (por ejemplo, alcachofa) e incluso aumentar su actividad antioxidante (por ejemplo, apio y zanahorias), mientras que otras verduras pierden sus propiedades (Jiménez-Monreal et al., 2009). El aumento de la actividad antioxidante después de la cocción de algunos vegetales es debida a que la destrucción térmica de

paredes celulares produce la liberación de compuestos antioxidantes, y por otro lado ciertos productos de la reacción de Maillard son antioxidantes (Morales and Babbel, 2002). Del mismo modo, se ha demostrado por ejemplo que en la carne las concentraciones de aminoácidos esenciales, con excepción de metionina e histidina, pueden disminuir marcadamente ante el aumento de la temperatura y el tiempo. (Deb-Choudhury et al., 2014). Otros autores han informado el efecto de tres métodos de cocción sobre la concentración de aminoácidos en carne de ternera, determinando que la cocción en parrilla fue el tratamiento que más afectó a la mayoría de los aminoácidos (Lopes et al., 2015). Debido a la alta capacidad de acumulación de Se en ajos, esta planta ha sido propuesta como una fuente natural de Se para la dieta humana y un alimento potencialmente funcional (Arnault and Auger, 2006). Sin embargo, a pesar de la importancia del ajo como fuente de Se, no se ha investigado hasta el momento los cambios producidos por diferentes procesos de cocción sobre la especiación de Se (Pyrzynska, 2009).

En el presente trabajo de tesis doctoral, se planteó la realización de investigaciones tendientes a responder el interrogante expuesto anteriormente. Por lo tanto, se propuso evaluar el efecto de cinco tratamientos térmicos de cocción (horno convencional, agua en ebullición, microondas, cocción con vapor y aceite a 180°C) sobre la estabilidad de las especies de Se no volátiles y de Se-proteínas en el ajo fortificado con Se. Para este propósito, se utilizaron diferentes técnicas del análisis de especiación elemental, tales como SEC-ICP-MS y AEC-ICP-MS, que permitieron evaluar la asociación de Se a proteínas y los cambios producidos sobre la misma con la cocción. Asimismo, se presentarán resultados sobre posibles modificaciones de Se-aminoácidos y especies inorgánicas de Se ante dichos tratamientos térmicos de cocción. Este estudio se llevó a cabo según lo indicado en la sección 2.4.

### 3.5.1- VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Se EN AJOS CON LOS MÉTODOS DE COCCIÓN

La concentración de Se en muestras de ajo fresco y procesado se obtuvo mediante el análisis por HG-AFS y bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.5.1. En este caso, el método analítico utilizado involucró la digestión de las muestras con una mezcla de ácidos como paso previo a la determinación de Se, tal como se indica en la sección 2.3.3.

Los estudios realizados en esta etapa del trabajo de tesis se centraron en evaluar cómo la concentración de Se podría modificarse cuando el ajo se sometió a diferentes tratamientos térmicos (Tabla 3.5.1). La concentración total de Se disminuyó entre el 6 al 11% cuando el ajo fue cocido en microondas, en vapor y en agua en ebullición. Mientras que las pérdidas de Se fueron más significativas cuando este se cocinó en un horno convencional (16%) y en aceite a 180°C (64%).

**Tabla 3.5.1.** Concentración de Se en muestras de ajo sometidas a diferentes métodos de cocción.

<b>Método de cocción</b>	<b>Concentración de Se (<math>\mu\text{g Se g peso seco}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Pérdida de Se (%)</b>
Ajo crudo	39,3 $\pm$ 0,05	---
Horno	32,9 $\pm$ 0,08	16
Agua en ebullición	36,7 $\pm$ 0,01	7
Microondas	35,1 $\pm$ 0,02	11
Cocción con vapor	37,0 $\pm$ 0,06	6
Aceite a 180°C	14,1 $\pm$ 0,03	64

<sup>a</sup>Los valores de concentración son el resultado de 3 determinaciones y 3 repeticiones de cada muestra tratada.

Se observó también que en aquellos tratamientos térmicos donde el ajo se cocinó en agua hirviendo y en vapor, estos tuvieron poco efecto y la concentración total de Se no se modificó drásticamente. Resultados similares se han reportado en champiñones y espárragos, mostrando pérdidas de Se del 44 y 29%, respectivamente (Higgs et al., 1972). Otros autores han encontrado que el Se puede perderse mínimamente cuando el brócoli se cocina en agua a ebullición (Pedrero et al., 2007). Por otro lado, los resultados en nuestro trabajo del análisis de los extractos de muestras que fueron cocinadas en agua a ebullición evidenció que la especiación de Se fue muy similar a la encontrada en brócoli cocido en agua en ebullición (Pedrero et al., 2007). Por analogía, la lixiviación de especies de Se solubles en medio acuoso puede ser la causa principal de estas pequeñas pérdidas de Se en agua en ebullición y en vapor. De otro modo, como el Se puede asociarse principalmente a proteínas, la extracción de Se en agua hirviendo o vapor se espera que sea mínima debido a una limitada solubilidad en un medio con valores medios a bajos de pH.

El tratamiento térmico por microondas no causó pérdidas importantes de Se, sin embargo, aquellas muestras tratadas en un horno convencional, por el contrario, mostraron pérdidas más significativas en valor de concentración de Se total. Este efecto podría ser atribuido a las diferentes condiciones utilizadas en ambos sistemas de cocción y responderían fundamentalmente a la temperatura más elevada que se alcanza en un horno convencional con respecto al de microondas (Bratakos et al., 1988). Otros autores han obtenido resultados similares pero para el S y cuando la cebolla fue sometida a estos tratamientos de cocción (Cavagnaro and Galmarini, 2012).

Finalmente, las mayores pérdidas en la concentración de Se se produjeron con la cocción del ajo en aceite a 180°C. Este hecho se puede atribuir a la lixiviación de Se desde la matriz orgánica del ajo al aceite, así como a la descomposición de Se-aminoácidos en

Se-compuestos volátiles, del tipo dimetilselenide o dimetildiselenide y ante las elevadas temperaturas alcanzadas durante este proceso de cocción (Bratakos et al., 1988; Khanam and Platel, 2016). Además, cabe mencionar que los aminoácidos libres son más reactivos que las proteínas bajo estas mismas condiciones, por lo que las pérdidas de proteínas y derivados son menores puesto que estas son solamente desnaturalizadas (Boskou and Elmadfa, 2016). Resultados similares han sido reportados durante la cocción de otros alimentos distintos al ajo, como es el caso del trigo, arroz, huevos y pollo (Higgs et al., 1972). Asimismo, se ha reportado que el contenido de Se y la biodisponibilidad en plantas disminuyó cuando fueron sometidas a diferentes métodos de cocción (Khanam and Platel, 2016). Este es un importante aspecto a considerar porque las principales fuentes de Se en la dieta humana son vegetales y generalmente se cocinan previo a su consumo.

### **3.5.2- INFLUENCIA DE LA COCCIÓN EN LOS PERFILES PROTEICOS ASOCIADOS A Se**

La asociación química de Se a diferentes fracciones de peso molecular en las muestras de ajo crudo y procesado se estudiaron mediante la técnica SEC-ICP-MS bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.5.3. Previo al fraccionamiento por SEC, se realizó una extracción de las Se-proteínas desde las muestras de ajo crudo y procesado con una solución de NaOH (ver sección 2.3.4) y los extractos así obtenidos fueron analizados por la técnica mencionada.

Los cambios en la asociación de Se a proteínas causados por los diferentes tratamientos de cocción fueron evaluados a los efectos de profundizar en posibles modificaciones en la especiación del elemento. Dichos estudios pueden considerarse muy importantes debido a dependencia que existe entre los efectos biológicos que potencialmente puede causar el Se y la naturaleza de sus especies químicas. Los perfiles

de fraccionamiento de Se en ajo crudo (Fig. 3.5.1a) evidenciaron la asociación de este elemento a fracciones de alto (7 kDa) y bajo peso molecular (2-5 kDa). Posteriormente, los perfiles de muestras sometidas a cocción por vapor, agua a ebullición, microondas y horno convencional fueron similares entre ellos (Fig. 3.5.1-2). En dichos cromatogramas se observó que el Se estuvo asociado principalmente a la fracción de bajo peso molecular de 2,2 kDa y a otras fracciones en el rango de 4 a 7 kDa. Curiosamente, se observó que la fracción de aproximadamente 2,2 kDa disminuyó con respecto a la encontrada en ajo crudo y este efecto fue más intenso ante procesos de cocción con temperaturas cada vez más elevadas. Finalmente, el perfil de fraccionamiento fue completamente modificado y el Se se halló asociado casi exclusivamente a una sola fracción de peso molecular de 4,4 kDa en el ajo cocido en aceite a 180°C, es decir, a la temperatura de cocción más alta (Fig. 3.5.2 c).

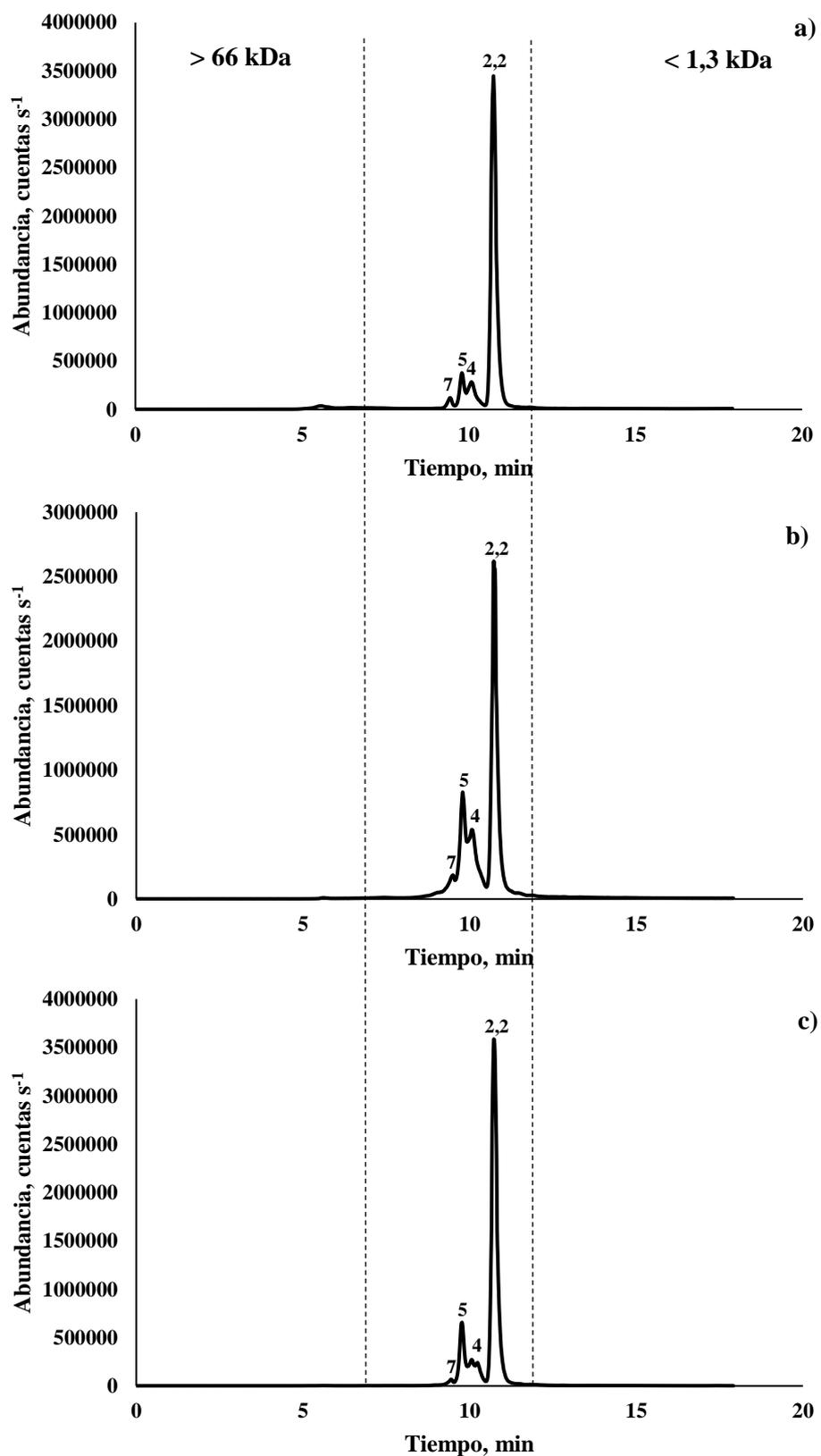


Figura 3.5.1: Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se) de muestras de ajo sometidas a diferentes métodos de cocción. a) Ajo crudo, b) Horno y c) Agua en ebullición

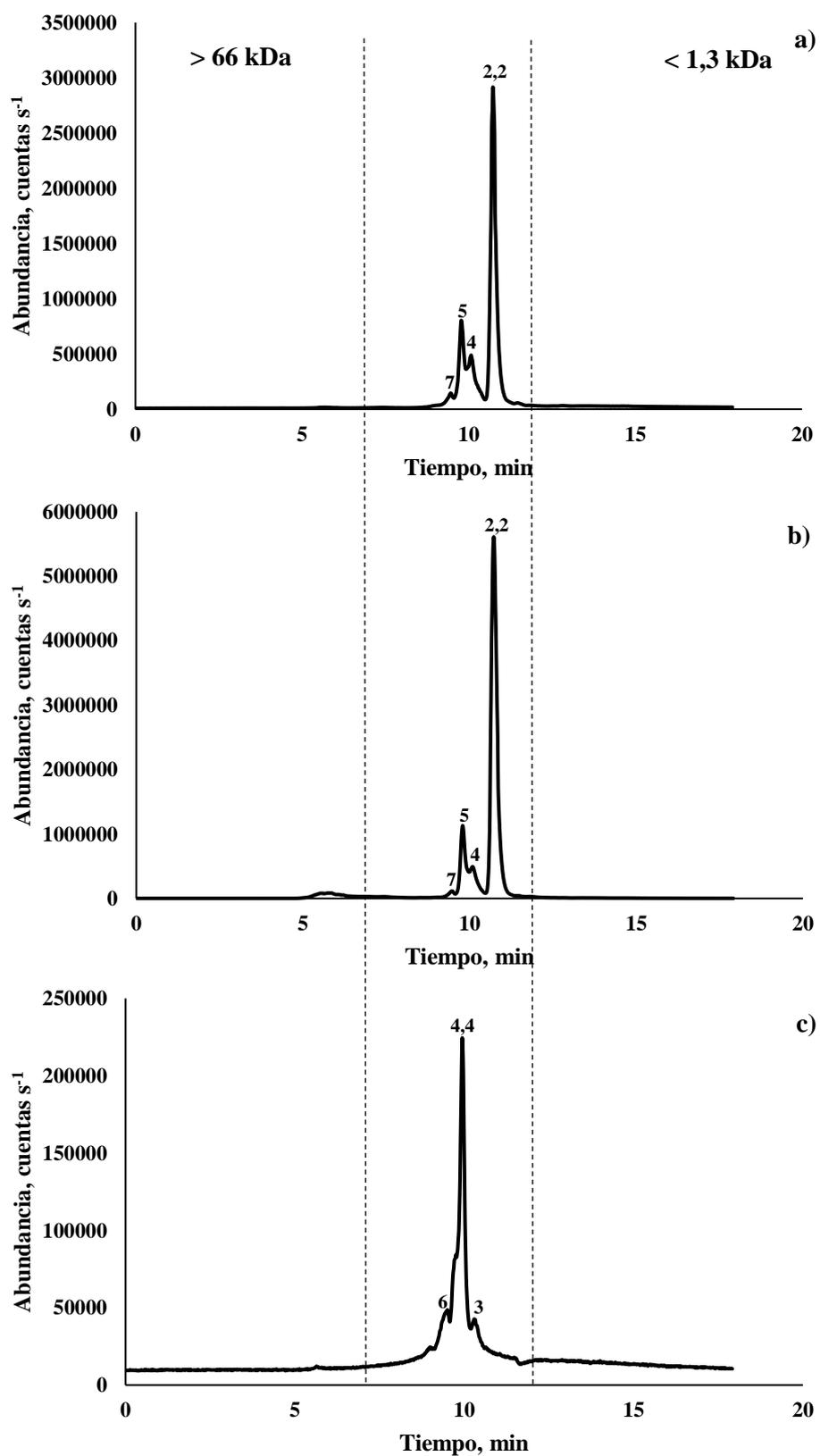
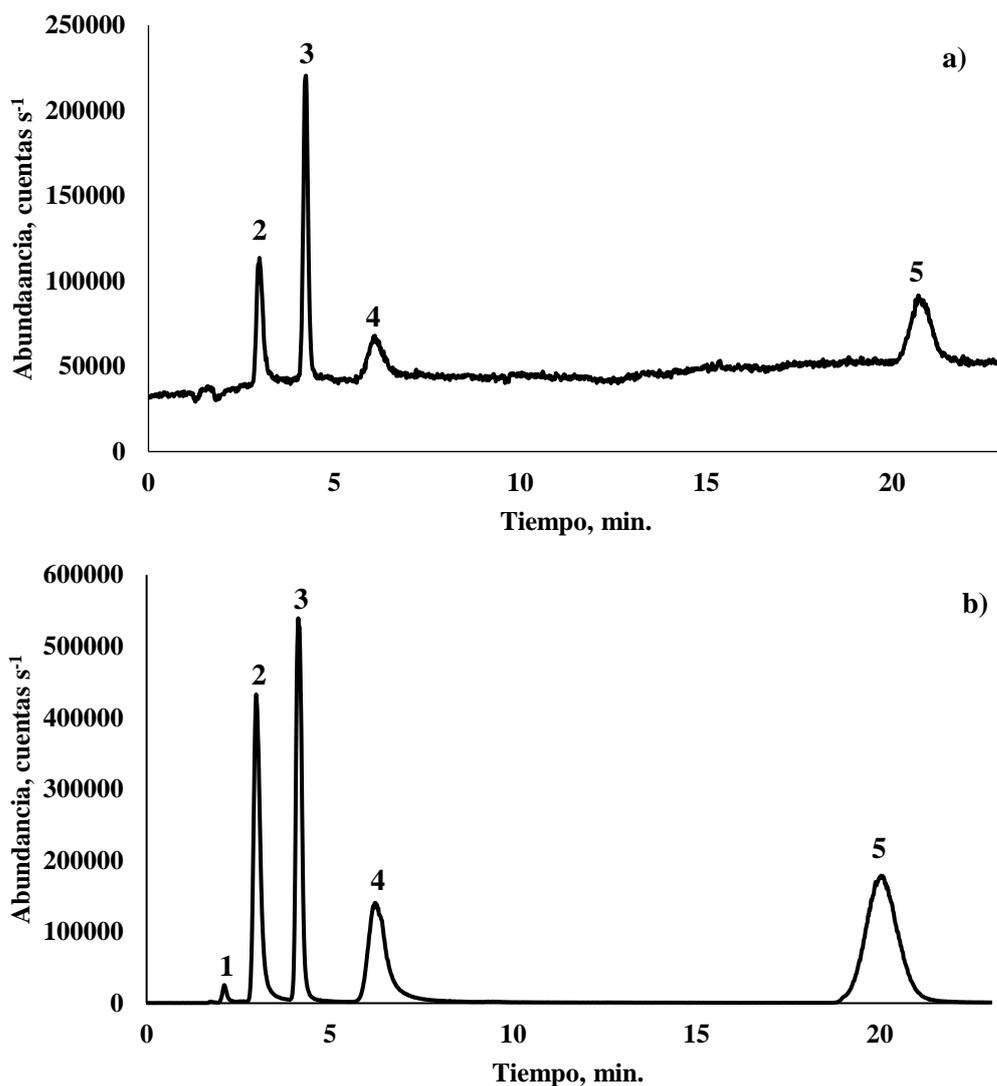


Figura 3.5.2: Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) de muestras de ajo sometidas a diferentes métodos de cocción. a) Microondas, b) Cocción en vapor y c) Aceite a  $180^\circ\text{C}$

Algunas explicaciones posibles para estos cambios en el fraccionamiento de Se ante los diferentes tratamientos térmicos, se pueden fundamentar en base a modificaciones químicas producidas en los alimentos con el calor. En general, los tratamientos térmicos producen cambios conformacionales en estructuras de proteínas y causan desnaturalización de las mismas (Shabbir et al., 2015). Del mismo modo, la temperatura, el tiempo de cocción y tipo de tratamiento térmico podría tener un efecto importante en el proceso de desnaturalización (Shabbir et al., 2015). De hecho, durante los tratamientos térmicos algunas reacciones bioquímicas, tales como la hidrólisis y la agregación, conducen a modificaciones en la estructura de las proteínas (Deb-Choudhury et al., 2014). Por lo tanto, los cambios en los perfiles de fraccionamiento de Se observados en el presente trabajo de tesis doctoral pueden ser explicados teniendo en cuenta dos efectos combinados: (i) la hidrólisis de proteínas para producir una mezcla de Se-peptidos de bajo peso molecular, y (ii) la formación de agregados proteicos insolubles inducidos por efecto del calor durante la cocción, lo cual contribuiría a una disminución significativa de las fracciones de alto peso molecular.

### **3.5.3- MODIFICACIONES EN LA ESPECIACIÓN DE Se EN AJOS FRENTE A LOS MÉTODOS DE COCCIÓN**

Los cambios en la especiación de Se en ajos sometidos a diferentes métodos de cocción fueron evaluados mediante el análisis por AEC-ICP-MS bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.5.3 y luego de la hidrólisis enzimática de las Se-proteínas mediante el procedimiento descrito en la sección 2.3.5. Las Figuras 3.5.3 a y b muestran los cromatogramas obtenidos de una mezcla de patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  y de una mezcla adicionada de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.5.3.



**Figura 3.5.3: Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se).** a) Mezcla de patrones de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  y b) Muestra adicionada de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV)

Diferentes especies de Se incluyendo, Se-MeSeCys, Se(VI), SeMet y una especie desconocida fueron observadas en ajo crudo (Fig. 3.5.4 (a)). Este cromatograma también revela que el Se se metabolizó principalmente como Se-MeSeCys, un importante Se-aminoácido que tiene actividad anticancerígena como se observó también en secciones anteriores.

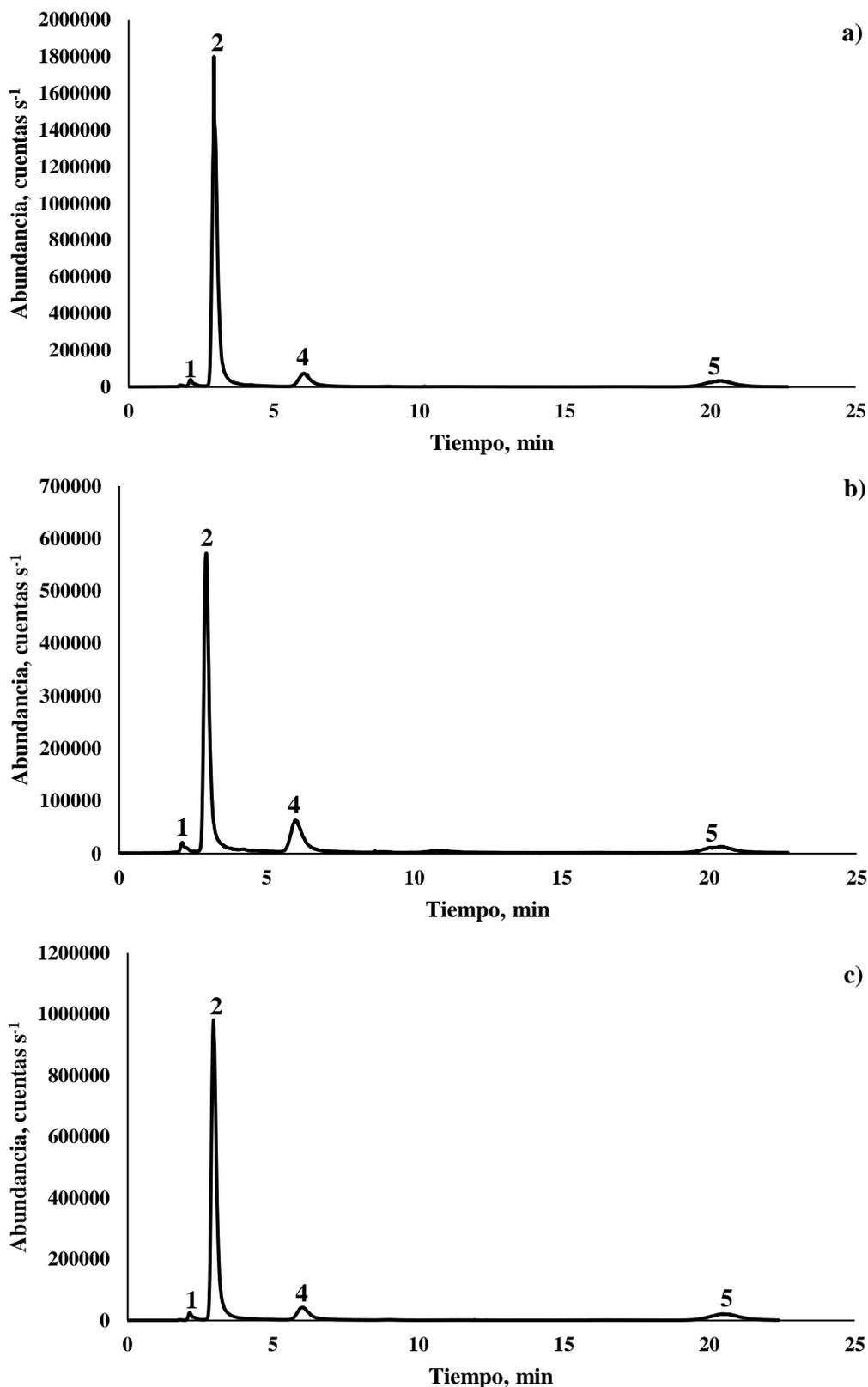
Las especies Se-MeSeCys, Se(VI), SeMet y una especie desconocida, también fueron observadas en muestras cocinadas en microondas, horno convencional, vapor y agua en ebullición (Figura 3.5.4-5). Mientras que en ajo cocido en aceite a 180°C se observó la presencia de Se(IV), Se(VI) y tres especies desconocidas (Fig. 3.5.5 c), indicando que Se-MeSeCys y SeMet podría haberse descompuesto parcialmente en otras especies de Se no identificadas debido a las altas temperaturas alcanzadas en este método de cocción.

Además, se estudió el efecto de los diferentes métodos de cocción sobre cada una de las especies de Se detectadas en este trabajo y los resultados se muestran en la Figura 3.5.6. En este caso se pudo observar que la concentración de Se-MeSeCys disminuyó cuando la temperatura del método de cocción se incrementó, mientras que las otras especies de Se se mantuvieron prácticamente sin cambios. Sin embargo, estos cambios fueron más evidentes cuando se analizaron muestras cocinadas en aceite a 180°C debido a las altas temperaturas alcanzadas en el aceite caliente. Ciertamente, estos efectos podrían atribuirse a la alta inestabilidad y volatilidad de algunos Se-aminoácidos (Higgs et al., 1972). Los resultados obtenidos acerca de las transformaciones de las especies de Se con los métodos de cocción, pueden analizarse a la luz de la similitud química entre Se y S, ya que también en el caso del S su concentración en el ajo es elevada. De hecho, se ha informado que los compuestos de Se tienden a ser térmicamente más inestables que los organoazufrados debido a que la electronegatividad de S (2.58) es más alta que la de Se, por lo que el radio molecular aumenta de 1,27 a 1,40 Å y la densidad de electrones disminuye (Jiménez et al., 2013). Esto determina que las interacciones electrostáticas establecidas por Se son más débiles, resultando en una disminución de la estabilidad intra- e intermolecular (Jiménez et al., 2013). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo también muestran que Se-MeSeCys es menos estable que SeMet a pesar del hecho de que

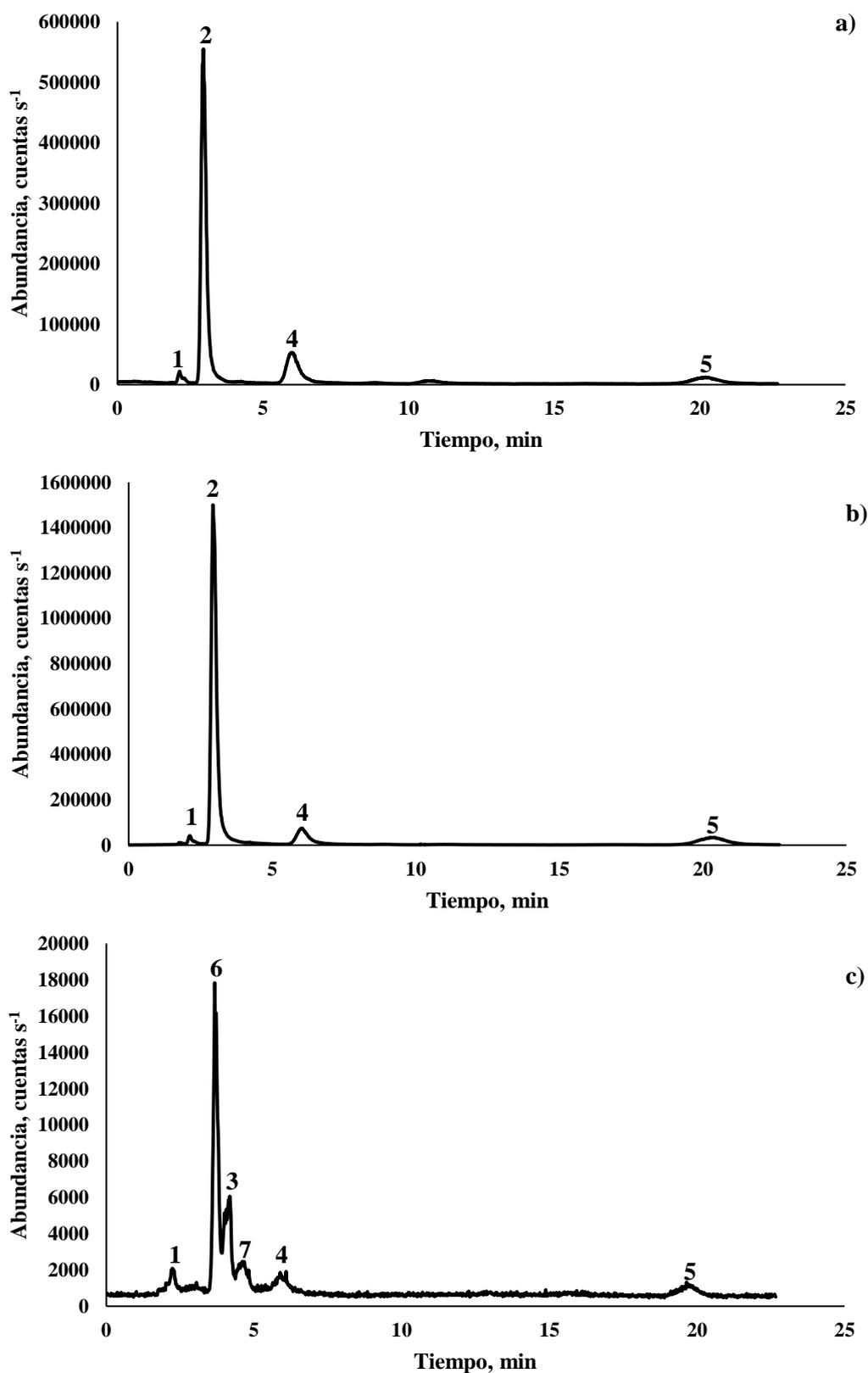
sus estructuras son similares. En este caso puede mencionarse que como Se-MeSeCys no está asociado a proteínas, como si lo puede estar SeMet, la especie Se-MeSeCys podría volatilizarse más fácilmente que SeMet ante temperaturas cada vez más elevadas que se impongan con los diferentes métodos de cocción (Higgs et al., 1972).

Finalmente, debe mencionarse que las modificaciones observadas en las investigaciones reportadas en este trabajo de tesis doctoral acerca de la especiación de Se, son coincidentes con las indicadas en brócoli cocido en agua a ebullición, donde también se ha demostrado que Se-MeSeCys puede descomponerse en otros compuestos desconocidos (Pedrero et al., 2007). También, se ha informado que la especiación de Se fue modificado en repollo hervido en agua (Funes-Collado et al., 2015).

En síntesis, las investigaciones realizadas en este trabajo de tesis doctoral, confirman que la manera de cocinar el ajo no solo puede modificar en mayor o menor medida la concentración total de Se en ajos, sino que además cambia la especiación de Se. Esta modificación en la especiación de Se podría tener un impacto notable en las propiedades del Se presente en el ajo, por ejemplo, su biodisponibilidad, señalando por lo tanto la necesidad de evaluar los beneficios reales de consumir alimentos enriquecidos con Se después de haber sido sometidos a diferentes procedimientos de cocción. Consecuentemente, para asegurar un consumo saludable de ajos enriquecidos con Se que hayan sido cocinados, es necesario continuar con investigaciones futuras relacionadas con una mayor identificación de las especies de Se formadas tras la cocción y los efectos biológicos de dichos compuestos. El trabajo realizado en la presente tesis doctoral abre la posibilidad futura a que otros investigadores profundicen acerca de estos aspectos tan interesantes derivados del Se y su incorporación en los alimentos.



**Figura 3.5.4:** Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS (<sup>82</sup>Se) de ajos sometidos a diferentes métodos de cocción. a) Ajo crudo, b) Horno y c) Agua en ebullición. 1) Compuesto desconocido; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV)



**Figura 3.5.5:** Cromatogramas obtenidos por AEC-ICP-MS ( $^{82}\text{Se}$ ) de ajos sometidos a diferentes métodos de cocción. a) Microondas, b) Vapor y c) Aceite a  $180^\circ\text{C}$ . 1) Compuesto desconocido 1; 2) Se-MeSeCys; 3) Se(IV); 4) SeMet; 5) Se(IV); 6) Compuesto desconocido 2; 7) Compuesto desconocido 3.

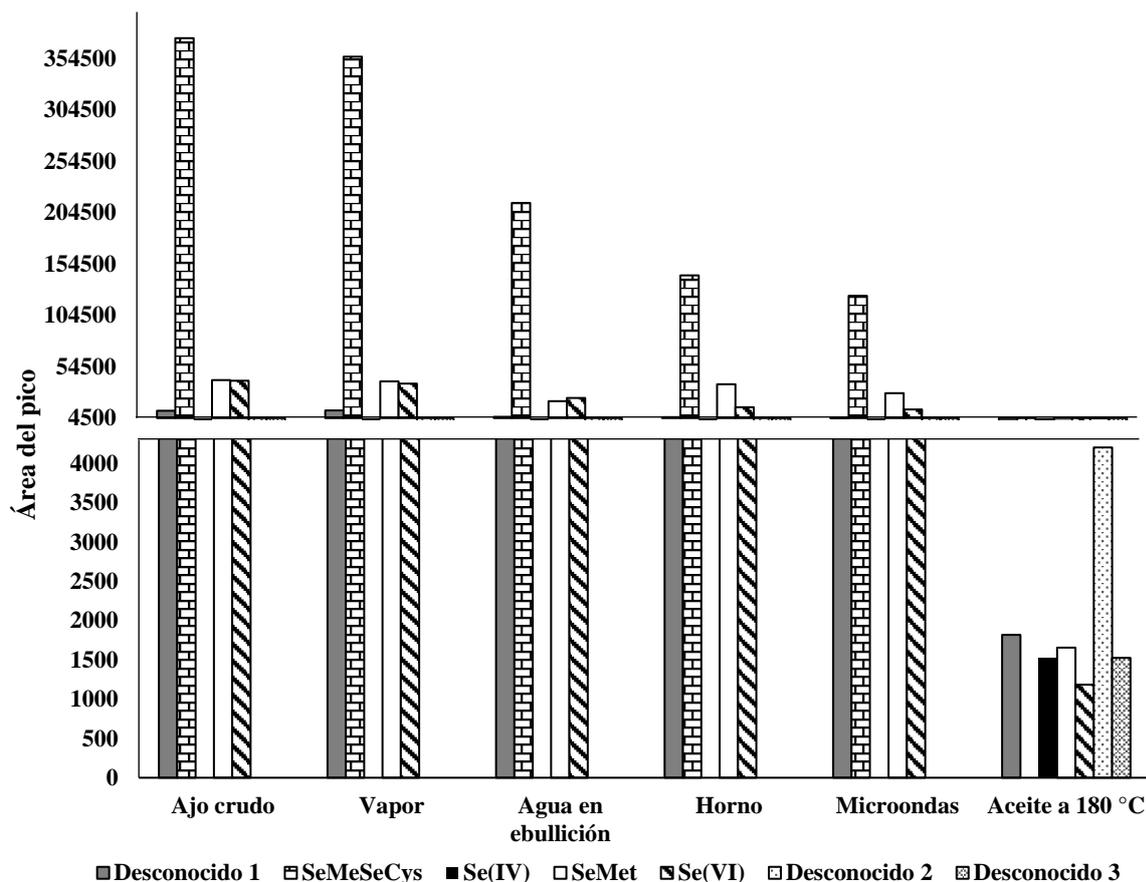


Figura 3.5.6: Efecto de tradicionales tratamientos térmicos de cocción en la distribución y concentración de especies de Se

### 3.5.4-BIBLIOGRAFÍA

Arnault, I., Auger, J., 2006. Seleno-compounds in garlic and onion. *J. Chromatogr. A* 1112, 23–30.

Battin, E.E., Zimmerman, M.T., Ramoutar, R.R., Quarles, C.E., Brumaghim, J.L., 2011. Preventing metal-mediated oxidative DNA damage with selenium compounds. *Metallomics* 3, 503–512.

Boskou, D., Elmadfa, I., 2016. *Frying of food: oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures*. CRC Press.

Bratakos, M.S., Zafirooulos, T.F., Siskos, P.A., Ioannou, P. V, 1988. Selenium losses on cooking Greek foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23, 585–590.

Cavagnaro, P.F., Galmarini, C.R., 2012. Effect of processing and cooking conditions on onion (*Allium cepa* L.) induced antiplatelet activity and thiosulfinate content. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8731–8737.

Deb-Choudhury, S., Haines, S., Harland, D., Clerens, S., van Koten, C., Dyer, J., 2014. Effect of cooking on meat proteins: mapping hydrothermal protein modification as a potential indicator of bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8187–8196.

El-Bayoumy, K., Sinha, R., Pinto, J.T., Rivlin, R.S., 2006. Cancer chemoprevention by garlic and garlic-containing sulfur and selenium compounds. *J. Nutr.* 136, 864S–869S.

Funes-Collado, V., Rubio, R., López-Sánchez, J.F., 2015. Does boiling affect the bioaccessibility of selenium from cabbage? *Food Chem.* 181, 304–309.

Higgs, D.J., Morris, V.C., Levander, O.A., 1972. Effect of cooking on selenium content of foods. *J. Agric. Food Chem.* 20, 678–680.

Ip, C., Lisk, D.J., 1993. Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic.

Jiménez-Monreal, A.M., García-Diz, L., Martínez-Tomé, M., Mariscal, M., Murcia, M.A., 2009. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *J. Food Sci.* 74, H97–H103.

Jiménez, I., Plano, D., Palop, J.A., Sanmartín, C., Lizarraga, E., 2013. Thermal stability of selenium, sulfur and nitrogen analogous phthalazine derivatives. *J. Therm. Anal. Calorim.* 111, 605–610.

Khanam, A., Platel, K., 2016. Bioaccessibility of selenium, selenomethionine and selenocysteine from foods and influence of heat processing on the same. *Food Chem.*

194, 1293–1299.

Lopes, A.F., Alfaia, C.M.M., Partidário, A.M., Lemos, J.P.C., Prates, J.A.M., 2015. Influence of household cooking methods on amino acids and minerals of Barrosã-PDO veal. *Meat Sci.* 99, 38–43.

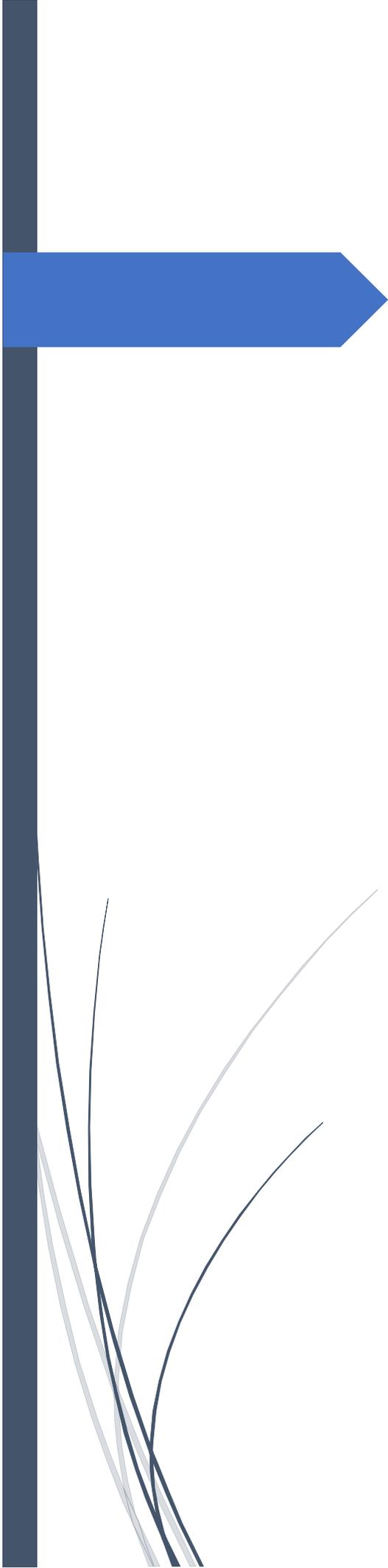
Morales, F.J., Babbel, M.-B., 2002. Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2788–2792.

Pedrero, Z., Elvira, D., Cámara, C., Madrid, Y., 2007. Selenium transformation studies during Broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (LC–ICP-MS). *Anal. Chim. Acta* 596, 251–256.

Pyrzynska, K., 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.* 114, 1183–1191.

Shabbir, M.A., Raza, A., Anjum, F.M., Khan, M.R., Suleria, H.A.R., 2015. Effect of thermal treatment on meat proteins with special reference to heterocyclic aromatic amines (HAAs). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 82–93.

Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.-J., Pussemier, L., 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem.* 130, 767–784.



# **Capítulo 4: Conclusiones**

#### 4.1-CONCLUSIONES

El trabajo realizado en la presente tesis doctoral ha incluido una gran diversidad de experimentos a los efectos de evaluar la biofortificación de ajos con Se, la captación de este elemento por la planta y el efecto en su desarrollo y la especiación de Se, tanto al final del ciclo de crecimiento del ajo como en las diferentes etapas. También, se ha investigado el efecto de diferentes métodos de cocción del ajo sobre la concentración total y las modificaciones en la especiación de Se, aspectos muy importantes a considerar para un posible procesamiento del ajo enriquecido luego de su cultivo.

A continuación se resumen las principales conclusiones que se desprenden del análisis de los resultados obtenidos tras estos experimentos y la discusión de los mismos:

✓ La biofortificación foliar de ajos con Se no afectó significativamente el rendimiento de los bulbos en los distintos clones de ajo estudiados (Nieve INTA, Unión FCA, Rubí INTA y Gostoso INTA), sin embargo se observó una acumulación de Se significativamente diferente entre los diversos clones tratados con Se y el testigo. También, la acumulación en las diferentes variedades clonales se vio incrementada a medida que aumentó la dosis aplicada. Sin embargo, la mayor parte del Se se metabolizó bajo la forma de diferentes especies inorgánicas que son tóxicas, por lo que la biofortificación foliar no sería una práctica muy conveniente para el enriquecimiento de ajo destinado para consumo.

✓ Cuando el Se se adicionó en el sustrato de crecimiento, la acumulación de Se resultó ser proporcional a las dosis utilizadas y no se afectó el crecimiento de los órganos del ajo cuando la dosis de Se fueron bajas. Por otro lado, dosis más elevadas que 45 kg Se ha<sup>-1</sup> afectaron significativamente el desarrollo de las plantas. Por lo tanto, la dosis de Se a aplicar es un factor muy importante a considerar para la correcta biofortificación del ajo sin afectar su desarrollo.

✓ La suplementación de Se produjo modificaciones significativas en la acumulación y distribución de otros nutrientes como Zn, Mg, Mn, Fe, Cu, P y S, lo que es un aspecto que no debe ser descuidado puesto que estos elementos son considerados nutrientes esenciales para las plantas y aseguran su normal desarrollo.

✓ El momento exacto en el que el Se debe aplicarse en cultivos de ajo se identificó como un factor crítico y determinó el nivel de acumulación del elemento en la planta, siendo el momento óptimo de aplicación aquel que corresponde al crecimiento vegetativo pero antes de la bulbificación, que es donde todo proceso metabólico se detiene.

✓ El Se es transformado en el ajo mayoritariamente como SeMeSeCys, un importante aminoácido precursor de otros compuestos del Se que tienen demostrada actividad anticancerígena, tal como el metil selenol. Así, se obtiene principalmente la especie SeMeSeCys cuando el Se es aplicado en el sustrato y no en las hojas, por lo que este tipo de aplicación es más conveniente que la vía foliar donde el Se inorgánico resulta ser la forma química más predominante.

✓ Si bien no se encontraron diferencias significativas en la especiación de Se cuando se compararon las cuatro variedades clonales, cuando el Se fue aplicado en el sustrato, las variedades coloradas demostraron mayor eficiencia de acumulación que las blancas y metabolizaron el Se mayoritariamente en especies orgánicas de este elemento.

✓ No solo los bulbos mostraron altas concentraciones de importantes Se-aminoácidos como el SeMeSeCys, sino también las hojas y raíces, por lo que estos órganos de la planta de ajo podrían también aprovecharse para el desarrollo de suplementos alimentarios enriquecidos en Se.

✓ Las diferencias en la acumulación y metabolización de Se entre las diferentes variedades clonales de ajo, podrían deberse a una variabilidad genética, por lo

que herramientas tales como el fitomejoramiento serían recomendables para obtener nuevos cultivares que posean alta capacidad de acumulación y metabolización del Se, principalmente hacia la formación de especies orgánicas funcionales.

✓ Los métodos de cocción tradicionales que involucran la aplicación de diferentes procesos físicos como el agua hirviendo, microondas, vapor, calentamiento en horno convencional y fritura en aceite caliente; causan cambios en las fracciones proteicas de Se y en los Se-aminoácidos identificados. Esto puede deberse fundamentalmente a la desnaturalización de proteínas o la hidrólisis de las mismas por activación de enzimas específicas que cumplan dicho rol. Además, la forma en que se cocina el ajo no solo produce cambios en la especiación de Se, sino que esto podría tener también un impacto notable en las propiedades del Se, como la biodisponibilidad, señalando así la necesidad de evaluar los beneficios reales de consumir alimentos enriquecidos con Se después de haber sido sometidos a diferentes procedimientos de cocción u otros tipos de procesamiento que deban aplicarse previo a su consumo.