



Estudio de bioacumulación de metales pesados en plantas de consumo humano para sensado molecular *In situ*

Yulieth Catherine Reyes Roa

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ingeniería
Bogotá, Colombia
2020

Estudio de bioacumulación de metales pesados en plantas de consumo humano para sensado molecular *In situ*

Yulieth Catherine Reyes Roa

Tesis o trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ingeniería

Director:
Edgar E González Ph.D.

Grupo de Investigación:
Grupo de Nanociencia y Nanotecnología

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ingeniería
Bogotá, Colombia
2020

Dedicatoria

Para los aprendices de todo el mundo. La naturaleza nos oculta tantos secretos que necesitamos mentes inquietas dispuestas a descifrar cada pieza del rompecabezas.

Agradecimientos

A Dios inicialmente por brindarme la oportunidad de mejorar profesionalmente, aprender y disfrutar cada momento de mi vida

Al Profesor Edgar González, director de esta tesis, por compartir conmigo su conocimiento y brindarme el apoyo, la confianza y la seguridad de desarrollar un buen trabajo.

A mi madre y mi esposo, porque son los amores más grandes de mi vida y siempre me motivan a dar saltos de gigante, incluso en los escenarios más inhóspitos.

A mi hermana y a mis amigos más cercanos porque siempre me brindaron palabras de aliento en los momentos más oscuros.

A Miguel Parra por la colaboración prestada durante el desarrollo de mi investigación.

A la Universidad Javeriana, las diferentes facultades, departamentos y su excelente equipo de trabajo, Al Laboratorio del Grupo de Investigación de Nanociencia y Nanotecnología al igual que al proyecto de investigación Nanosens, porque me brindaron apoyo y recursos físicos para el desarrollo de mi trabajo.

Finalmente, a la Fundación Ceiba Bogotá por financiar mis estudios de Doctorado mediante la beca Rodolfo Llinás.

1 CONTENIDO

1	CONTENIDO	5
2	JUSTIFICACIÓN Y DEFINICIÓN DE PROBLEMA.....	12
3	OBJETIVOS	14
4	ESTUDIO COMPARATIVO DE BIOACUMULACION E INLUENCIA EN LA TRANSLOCACIÓN DE NUTRIENTES EN TEJIDOS DE PLANTAS DE ALBAHACA (<i>OCIMUM BASILICUM</i>) EXPUESTAS A CADMIO.	15
4.1	INTRODUCCIÓN.....	15
4.2	TRANSPORTE Y BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN PLANTAS	16
4.2.1	Generalidades.....	16
4.2.2	Transporte de solutos a través de la membrana	17
4.2.3	Proteínas de transporte.....	18
4.2.4	Bioacumulación de metales pesados en plantas	19
4.2.5	Efectos fisiológicos de Metales pesados en plantas	21
4.2.6	Metales pesados en plantas aromáticas y Normatividad	22
4.3	IDENTIFICACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO	23
4.3.1	Materiales y métodos.....	24
4.3.2	Análisis de concentración de metales y metaloide en raíz, tallo y hoja en la planta seleccionada como objeto de estudio.....	28
4.3.3	Influencia del metal seleccionado en la absorción de macronutrientes y micronutrientes.....	29
4.4	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
4.4.1	Vigilancia Tecnológica.....	29
4.4.2	Exposición en plantas preseleccionadas cultivadas en tierra con exposición de metales pesados Hg, Cd, Pb y metaloide As	31
4.4.3	Acumulación de Cd en especies preseleccionadas en cultivos de agua	31
4.4.4	Bioacumulación	32
4.4.5	Cambios morfológicos en plantas expuestas a Cd cultivadas en agua	33
4.4.6	Bioacumulación y translocación de Cd en partes vegetativas de plantas de albahaca	35
4.4.7	Un modelo para transporte y bioacumulación del Cd en raíces, tallos y hojas de plantas de albahaca.....	38
4.4.8	Estudio de Bioacumulación de Cd ²⁺	43
5	CONFIGURACIÓN RADIOMÉTRICA FLUORESCENTE TIPO OFF-ON PARA DETECCIÓN DE Cd	48
5.1	INTRODUCCIÓN.....	48
5.2	MARCO TEÓRICO	49
5.2.1	Biosensores.....	49
5.2.2	Sensores moleculares basados en fluorescencia.....	52

5.2.3	Sensores fluorescentes para detección de Cd	56
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS	59
5.3.1	Materiales.....	59
5.3.2	Configuración del sensor molecular	59
5.3.3	Mediciones de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia	61
5.4	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
5.4.1	Preselección de fluoroforos y molécula	62
5.4.2	Estudio de fluorescencia para quinolina Yellow y rodamina B disuelta en agua mili Q y Etanol. 64	
5.4.3	Estudio de fluorescencia para y con molécula DETA	72
5.4.4	Caracterización de RBOHD (70-30%) con Cd a concentraciones de 1-10-100 y 1000µg/l mediante espectros de absorbancia y espectros de emisión y excitación de fluorescencia	77
6	DETECCIÓN <i>IN SITU</i> DE Cd EN PLANTAS DE ALBAHACA.....	89
6.1	INTRODUCCIÓN.....	89
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS	90
6.2.1	Materiales.....	90
6.2.2	Detección del lugar de actuación del Cd en raíces de albahaca.....	90
6.2.3	Caracterización de raíces por microscopia óptica y electrónica (SEM).	91
6.2.4	Detección de Cd ²⁺ de raíces de albahaca con configuración radiométrica fluorescente RBOHD92	
6.2.1	Rendimiento cuántico.....	93
6.3	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	93
6.3.1	Caracterización de fijación del Cd ²⁺ en las raíces de albahaca.....	94
	Caracterización de raíces por microscopia óptica y electrónica de barrido (SEM).....	98
6.3.2	Detección de Cd ²⁺ en raíces de albahaca con configuración radiométrica fluorescente RBOHD 100	
6.3.3	Rendimiento cuántico de configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) con iones de Cd ²⁺ sujetos a raíces de albahaca.	103
6.4	CONCLUSIONES.....	104
6.4.1	OBJETIVO 1-2	104
6.4.2	OBJETIVO 3	105
6.4.3	OBJETIVO 4	106
7	PROYECCIONES	107
8	ABREVIATURAS	108
9	GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	109
10	REFERENCIAS	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de transporte y proteínas transportadoras. Adaptado de [46]	18
Figura 2. Absorción foliar de metales pesados. elaborado por el autor	20
Figura 3. Cultivo en tierra de especies preseleccionadas.....	25
Figura 4. Diagrama metodológico de cultivos realizados en tierra.	26
Figura 5. Montaje experimental para cultivo en agua de las plantas preseleccionadas	27
Figura 6. Diagrama metodológico de cultivos de raíz flotante.....	28
Figura 7. Productividad científica en Cd en plantas en la ventana de los últimos 10 años.....	29
Figura 8. <i>Productividad científica por país relacionada con el problema del Cd en plantas de consumo humano.</i>	30
Figura 9. Concentraciones de Cd en plantas de albahaca, hierbabuena, espinaca y zanahoria cultivadas en agua y analizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama directa de acetileno (AAS).32	
Figura 10. BCF de plantas expuestas a Cd (100µg/l) en agua.....	33
Figura 11. Fotografías de plantas expuestas a Cd (100µg/l) tomadas durante los días 1,3,5 y 7.	34
Figura 12. Cambios morfológicos presentados en plantas control (Hierbabuena, espinaca, albahaca y zanahoria).....	34
Figura 13. Acumulación de Cd en raíces, tallos y hojas de plantas de albahaca expuestas a diferentes concentraciones.10µg/l, 50µg/l, 100µg/l.	36
Figura 14. Líneas de tendencia para la concentración de Cd en raíz, tallo y hojas en función de la concentración de Cd en el medio de cultivo	37
Figura 15. Factor de translocación (FT) de plantas de albahaca expuestas a concentraciones de Cd de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.	38
Figura 16. Análisis de comparaciones Dunn’s all-pairwise para Ca, Mg Y K en raíz, tallo y hoja por concentraciones de Cd de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.	40
Figura 17. Análisis de comparaciones Dunn’s all-pairwise para Fe, Mn Y Zn en raíz, tallo y hoja por exposición a Cd a concentraciones de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.	42
Figura 18. Movilidad del Cd en el medio ambiente. Imagen elaborada por el autor.....	44
Figura 19. Proceso de bioacumulación de Cd en plantas. Imagen elaborada por el autor.	47
Figura 20. Estructura de un biosensor. Imagen elaborada por el autor	49
Figura 21. Fenómeno de fluorescencia Tomado de valeur. ¹⁵⁶	53
Figura 22. Representación esquemática del funcionamiento de un sensor molecular con mecanismo PET. Imagen elaborada por el autor.....	54
Figura 23. <i>Mecanismo PET-OFF y PET-ON en sensores moleculares. Sistema PET-OFF tomado de Meng et.al 2018 y sistema PET ON-OFF tomado de Shi et.al 2013.</i>	54
Figura 24. Mecanismo de fluorescencia tipo FRET. Imagen elaborada por el autor.....	55
Figura 25. Sensor molecular con mecanismo FRET para detección de Cr ³⁺ reportado por Adhikari et.al 2019	55
Figura 26. Número de publicaciones asociadas a sensores fluorescentes para detección de Cd obtenida por Scopus.	56
Figura 27. Esquema del sensor fluorescente colorimétrico reportado por Wang et.al ¹⁶⁹ para detección de Cd ²⁺ en granos de arroz expuestos a diferentes concentraciones de Cd.....	58
Figura 28. Esquema de preparación de fluoroforos (Quinolina Yellow y Rodamina B) a concentraciones de 1-10-100-1000µg/l en agua mili Q y EtOH.....	60
Figura 29. Espectrofotómetro UV-Vis y espectrofotómetro de fluorescencia empleados para medición.	62
Figura 30. Estructura molecular Quinolina yellow	62
Figura 31. Estructura molecular Rodamina B.....	63

Figura 32. Estructura molecular de la Diehylene triamine	64
Figura 33. Mediciones de Quinolina yellow a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disuelta en agua (QYH) y etOH (QYOH).	65
Figura 34. Mediciones de Rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disuelta en solventes de agua (RBH) y etOH (RBOH).	66
Figura 35. Espectros de Emisión y Excitación de Quinolina a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en Agua Mili Q (QYH).	68
Figura 36. Espectros de Emisión y Excitación de Quinolina a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en EtOH.	69
Figura 37. Espectros de Emisión y Excitación de Rodamina B a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en Agua Mili Q.	70
Figura 38. Espectro de emisión Rodamina B a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en EtOH.	71
Figura 39. Fluoroforos disueltos en agua y etOH a diferentes concentraciones.	71
Figura 40. Espectros de absorbancia de QYOH y RBOH disueltas con DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%.	73
Figura 41. Espectros de Emisión y Excitación de QYOH a radios de volumen (90-10%; 80-20%; 70-30%) ...	75
Figura 42. Espectros de Emisión y Excitación de RBOHD a radios de volumen (90-10%; 80-20%; 70-30%) ...	76
Figura 43. Colorimetría de soluciones de QYOH y RBOH con molécula DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%.	76
Figura 44. Espectros de absorbancia para RBOHD con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l).	79
Figura 45. Colorimetría de la solución RBOHD (70-30%) a pH 3.75 con concentraciones de Cd a 1-10-100-1000µg/l.	79
Figura 46. Colorimetría de RBOH a diferentes valores de pH.	80
Figura 47. Espectros de absorbancia, emisión y excitación para RBOH a valores de pH entre 2-10.	82
Figura 48. Espectros de emisión y excitación de fluorescencia de RBOHD (70-30%) con pH 7.0 y concentraciones de Cd entre 1-1000µg/l.	84
Figura 49. Colorimetría de la solución RBOHD (70-30%) a pH 7.0 con concentraciones de Cd a 1-10-100-1000µg/l.	84
Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia para RBOHD (70-30%) a pH 7.0 con diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb, Cu) a concentraciones de 100 y 1000µg/l.	85
Figura 51. Diagrama de barras de respuestas de fluorescencia (I576nm/I568nm) de la RBOHD (70-30%) a pH de 7.0 con los diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb y Cu).	86
Figura 52. Electrones libres de la Rodamina B y la molécula DETA.	87
Figura 53. Configuración radiométrica fluorescente tipo OFF-ON de RBOHD para detección de Cd ²⁺	88
Figura 54. Montaje experimental para detección de absorción o adsorción de Cd ²⁺ en raíces de albahaca. ..	91
Figura 55. Montaje experimental para detección de Cd ²⁺ en raíces de albahaca en configuración radiométrica fluorescente RBOHD.	92
Figura 56. Estudio de Bioacumulación de Cd en Albahaca en diferentes países del mundo.	93
Figura 57. Estudio de detección de Cd en Albahaca en diferentes países del mundo.	94
Figura 58. Resultados promedio de concentración de Cd para los diferentes tipos de raíz: raíz seca (RS), raíz en fresco (RF) y raíz de la planta (RP).	95
Figura 59. Gráfica de residuos para las concentraciones de Cd en los diferentes tipos de raíz (RS, RF, RP). ..	95
Figura 60. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias.	97
Figura 61. Microscopía óptica de raíz de Albahaca.	99
Figura 62. Microscopía óptica y electrónica SEM de raíces de plantas de albahaca.	100
Figura 63. Espectros de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia de raíces control y raíces expuestas a Cd.	102

Figura 64. Colorimetría de la configuración radiométrica fluorescente (RBOHD) en raíces de plantas de albahaca control y raíces de plantas expuestas a Cd. 103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos ATPasas en la membrana celular. Tomado de 46	19
Tabla 2. Límites máximos permisibles de concentración de Cd y Pb en hortalizas, según legislación del Codex alimentarius 193-1995 y Unión Europea (UE) 2017. ^{69,70}	23
Tabla 3. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados en bolsas filtrantes para infusión. Valores tomados de Hµgret. ⁷³	23
Tabla 4. Resultados de concentración de Hg, As, Cd y Pb en plantas de hierbabuena, albahaca, espinaca, zanahorias expuestas a concentraciones de 10 µg/l (Exp1) y 100 µg/l (Exp2) durante un periodo de dos meses.....	31
Tabla 5. Resultados de concentración de Cd para cada especie vegetal con su respectiva desviación estándar (DS). Los resultados fueron obtenidos por técnica analítica de absorción atómica.....	32
Tabla 6. Concentraciones de Cd en plantas seleccionadas con sus respectivas mediciones de pH.....	35
Tabla 7. Resultados de concentración de Cd en raíz, tallo y hoja de plantas de albahaca y resultado del factor de translocación (FT)	36
Tabla 8. Media de concentración de nutrientes en tejidos vegetales de plantas de albahaca expuestas a concentraciones de Cd: 10µg/l, 50 µg/l y 100 µg/l.	39
Tabla 9. Propiedades físicas y químicas del Cd	43
Tabla 10. Familias transportadoras que intervienen en el transporte de Cd u otros elementos al interior de la planta. Tomado de Clemens y Ma34, Adamczyk-Szabela et al. ⁵¹	45
Tabla 11. Clasificación de biosensores por elemento de bioreconocimiento. Información tomada de Alhadrami. ¹³³	50
Tabla 12. Clasificación de biosensores por el tipo de transducción. Información tomada de Vinet y Zhedanov. ¹³⁴	50
Tabla 13. Tipos de luminiscencia. tomado de Valeur. ¹⁵⁶	52
Tabla 14. Química de coordinación del Cd tomada de Borsari. ¹⁰⁹	57
Tabla 15. Concentraciones empleadas para preparar soluciones en agua y EtOH de fluoroforos (quinolina Yellow y Rodamina B) a concentraciones de 1-10-100 y 1000µg/l	59
Tabla 16. Valores de concentración de fluoroforo disuelto en agua (FH) o etOH (FOH) con molécula DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%	60
Tabla 17. Valores de concentración de fluoroforo-DETA a concentraciones de Cd entre 1 a 1000µg/l.....	61
Tabla 18. Mediciones de absorbancia de quinolina yellow y rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disueltos en solventes: agua y etOH	64
Tabla 19. Wavelength (nm) de mediciones de absorbancia de quinolina yellow y rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disueltos en solventes: agua y etOH	65
Tabla 20. Resultados de emisión y excitación en unidades arbitrarias de fluorescencia para fluoroforos a diferentes concentraciones disueltos en agua mili Q y etOH.....	67
Tabla 21. variaciones de longitud de onda para fluoroforos a diferentes concentraciones disueltos en agua mili Q y etOH.	67
Tabla 22. Resultados de absorbancia para QYOH y RBOH con DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20%, 70-30%.....	72
Tabla 23. Resultados de emisión y excitación para FH y FOH con DETA a a radios de volumen 90-10%, 80-20%, 70-30%.....	74
Tabla 24. Resultados de absorbancia, Emisión y Excitación para RBOHD (70-30%) con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l).	77
Tabla 25. Resultados de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia para RBOH a diferentes valores de pH	80

Tabla 26. Resultados de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia de RBOHD (79-30%) con pH 7.0 y concentraciones de Cd de 1-1000µg/l.....	82
Tabla 27. Valores de respuestas de fluorescencia de la RBOHD (70-30%) a pH de 7.0 con los diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb y Cu).....	86
Tabla 28. Resultados de concentración de Cd para los diferentes tipos de raíz: raíz seca (RS), raíz en fresco (RF) y raíz de la planta (RP).....	94
Tabla 29. Análisis de varianza de dos factores (Día, tipo de raíz) e interacción entre los dos factores (Día*tipo raíz) con un nivel de confianza del 95%.....	96
Tabla 30. Resultados de pruebas de hipótesis del análisis de varianza de dos factores (Día, tipo de raíz) e interacción entre los dos factores (Día*tipo raíz) con un nivel de confianza del 95%.	96
Tabla 31. Comparaciones por parejas de Tukey: TIPO RAÍZ con un nivel de confianza del 95%	97
Tabla 32. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias.....	97
Tabla 33. Dimensiones de algunas capas celulares de raíces de albahaca.	98
Tabla 34. Mediciones de absorbancia y excitación a una longitud de onda de 550nm y intensidades de emisión a una longitud de onda de 576nm.	101
Tabla 35. Rendimiento cuántico de configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) con iones de Cd ²⁺ sujetos a raíces de albahaca.....	103

2 JUSTIFICACIÓN Y DEFINICIÓN DE PROBLEMA

Para la sociedad del siglo XXI, la contaminación ambiental se ha convertido en uno de los problemas de mayor impacto y relevancia que comprometen el ideal de sostenibilidad y desarrollo. Las matrices de aire, agua y suelo son las fuentes de mayor concentración de contaminantes, en las que se destacan los metales pesados en diferentes especiaciones y cantidades. Estos contaminantes se bioacumulan en animales tales como peces y moluscos, y se incorporan en una variedad de especies de plantas para consumo humano.^{1,2,3,4,5}

Un gran número de países han reportado la presencia de metales pesados en hortalizas u otros alimentos de consumo humano, lo que ha incrementado el número de investigaciones y estudios. Así, por ejemplo, en China e India se trabaja intensamente con el fin de i) evaluar la acumulación sobre las hojas de vegetales expuestas a fertilizantes que contienen grandes cantidades de cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg) entre otros. ii) Identificar la toxicidad causada por consumo de hortalizas como brócoli y lechuga. iii) analizar riesgos en la salud por ingesta de vegetales (irrigadas con aguas contaminadas), cereales y leche. iv) entender la bioacumulación de metales en algunas especies como calabaza de botella, calabaza esponja, coliflor, repollo, berenjena, tomates, amaranto, calabaza, rábano, trigo y arroz.³⁻⁵ En Estados Unidos ya se han empezado a desarrollar modelos de transporte de productos químicos orgánicos y metales pesados en sistemas de agua y suelos.^{6,7} En el caso de Colombia, específicamente los vertimientos a los que se ve sometido el río Bogotá a lo largo de su recorrido son empleados por pobladores que habitan el margen del río para la producción de hortalizas. Estudios realizados por diferentes universidades, han encontrado elementos traza como: arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), mercurio (Hg), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb), estaño (Sn), zinc (Zn), y una amplia variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas potencialmente tóxicas en hortalizas de consumo humano tales como: lechuga, repollo, apio y brócoli.^{8,9}

Para el caso de las plantas aromáticas, países como Turquía e India han reportado la presencia de metales pesados en bebidas de infusión tales como el té negro, el té verde y manzanilla, esto como consecuencia de un ineficiente control en el proceso de cultivo.^{10,11} Las plantas aromáticas presentan un amplio portafolio como materia prima para la producción en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Según un informe del 2014 presentado por el ministerio de agricultura (Informe del ministerio de Agricultura del 2014) en Colombia, el área de cultivo de plantas aromáticas ocupaba menos del 1% de la superficie cultivable y durante los años de 2009 a 2014 el área de cultivo se incrementó en un 10%. Entre los departamentos que cultivan plantas aromáticas se destacan: Antioquia (21%), Cundinamarca (20%), Valle del Cauca (16%), Putumayo (16%), Guajira (9%) y Choco (8%). En Cundinamarca se cultivan principalmente: las hierbas aromáticas y condimentarias con fines de exportación y para atender la demanda local.

La producción con fines de exportación presenta un sistema tecnificado con alta inversión por hectárea, sistemas de riego, invernaderos, plántulas, insumos agropecuarios y semillas proveniente de proveedores especializados. De otra parte, el sistema de producción tradicional conformado por cultivos pequeños, no poseen equipos de riego ni manejo técnico de cultivo, lo que favorece el uso de aguas contaminadas y abonos con potenciales efectos negativos en agua y suelo. De estos cultivos – se abastecen directamente las plazas de mercado y en menor medida la industria alimenticia.

En Colombia, algunos estudios académicos han reportado la presencia de metales y metaloides tales como Hg, As, Cd y Pb en diferentes concentraciones para especies de hortalizas tales como: lechuga escarola, el repollo, el brócoli y el apio, cultivadas en los municipios de Soacha y Mosquera, los cuales emplean el agua del río Bogotá como agua de riego. Este tipo de agua se caracteriza por su alto contenido de sales, contaminantes orgánicos y metales pesados. Estos productos con problemas de contaminación son distribuidos a las principales plazas de la ciudad de Bogotá.^{8,12,13}

Adicional a ello, muchos de los productos que llegan a plazas de mercado no realizan protocolos de monitoreo para verificar límites de contaminación. Estos protocolos no se realizan porque los métodos convencionales utilizados para análisis químico de muestras de agua, en términos de detección de metales pesados (métodos espectrométricos, electroanalíticos y cromatográficos) presentan algunas limitaciones en cuanto a costo, portabilidad, tiempos de medición, pretratamiento de muestras, etc.¹⁴⁻¹⁶ Estas dificultades operativas y de costo motivan el desarrollo de sistemas portables, económicos y sensibles que puedan ser utilizados directamente *In situ*.¹⁶⁻¹⁹ Por lo tanto, se hace necesario reunir información y desarrollar estrategias de monitoreo y registro de presencia de contaminantes en plantas, que permitan establecer niveles de riesgo e impacto en seres vivos y medio ambiente.

Debido a esta delicada problemática de contaminación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunas autoridades ambientales y de salud, han establecido niveles permitidos de concentración de metales en aguas de consumo humano y alimentos. Aunque se establecen los límites máximos permisibles de contaminación para agua de consumo, Hg en peces y algunas hortalizas de hoja, no se han establecido para algunas especies vegetales incluyendo plantas aromáticas de consumo en peso fresco.¹²

Para hacer frente a la problemática planteada de contaminación en plantas de consumo humano por metales pesados, se requiere tener suficiente comprensión de los procesos involucrados con movilidad e internalización. La literatura reporta bioacumulación en diferentes partes de la planta, pero aún es insuficiente la información sobre las rutas de ingreso en función del tipo de exposición, así como sitios de fijación y bioacumulación determinados directamente *in Situ*. Alcanzar este nivel de comprensión, va a permitir diseñar estrategias eficientes para detección (sensado) mitigación y remediación. Este trabajo está dirigido a explorar desde un punto de vista molecular, la fenomenología involucrada con movilidad y bioacumulación de metales pesados, específicamente Cd, para trazar una hoja de ruta en el diseño de sensores moleculares de fluorescencia.

En este contexto, la problemática que aborda este trabajo se orienta a responder la siguiente pregunta de investigación: *¿Cómo detectar y monitorear la acumulación de metales pesados en plantas de consumo humano, para obtener información que permita comprender y evaluar los procesos de transferencia y bioacumulación?* Para dar respuesta a esta pregunta, se planteó una metodología que permitiera a partir de una fase teórico experimental y de diseño y desarrollo, identificar el objeto de estudio, formular un modelo de transferencia y bioacumulación del metal, así como desarrollar una propuesta de detección basada en fluorescencia molecular.

3 OBJETIVOS

OG: Realizar un estudio de transferencia y bioacumulación de metales pesados para sensado molecular *In situ* en plantas de consumo humano.

OE1: Realizar un estudio comparativo de bioacumulación de metales pesados y metaloides, específicamente: Hg, As, Cd y Pb en aromáticas y hortalizas cultivadas en laderas del río Bogotá, para establecer los criterios de selección del metal pesado y el blanco correspondiente de detección

OE2: Elaborar un modelo de transferencia y bioacumulación del metal pesado de interés en la planta seleccionada.

OE3: Diseñar una configuración radiométrica fluorescente tipo OFF-ON para detección específica del metal pesado seleccionado en la planta seleccionada.

OE4: Evaluar el rendimiento de la configuración radiométrica, así como su sensibilidad y especificidad respecto al metal pesado detectado y planta seleccionada.

4 ESTUDIO COMPARATIVO DE BIOACUMULACION E INFLUENCIA EN LA TRANSLOCACIÓN DE NUTRIENTES EN TEJIDOS DE PLANTAS DE ALBAHACA (*OCIMUM BASILICUM*) EXPUESTAS A CADMIO.

4.1 INTRODUCCIÓN

La movilización de metales pesados presentes en el aire, el suelo y el agua hacia plantas de consumo humano, representa uno de los mayores problemas de seguridad alimentaria.^{6,20,21} Las verduras por su alto contenido de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales representan uno de los más importantes recursos alimenticios.^{22,23} En muchos países, el consumo de verduras es significativamente alto en comparación con otros alimentos como la carne. Sin embargo, la presencia de metales pesados como Hg, As, Cd y Pb en verduras como la calabaza, calabaza esponjosa, coliflor, col, berenjena, tomate, amaranto, rábano, trigo y arroz, plantea la urgente necesidad de incrementar esfuerzos en detección, mitigación y remediación.^{6,24,25}

En otras especies, como las plantas aromáticas, se ha identificado la presencia de metales pesados, los cuales pueden transferirse a bebidas de infusión, como el té negro, el té verde y la manzanilla.^{10,11,26} Las plantas aromáticas son de frecuente uso como materia prima en una gran variedad de preparaciones alimenticias, así como para la industria cosmética y farmacéutica, en la que se valora por sus componentes químicos.²⁷⁻²⁹ La regulación existente en Europa para bolsas de filtro, según la Farmacopea Europea, establecen valores de 0.1 µg / g para mercurio, 0.5 µg / g para cadmio y 5 µg / g para Pb. En países como Colombia, este tipo de requerimientos para control de metales pesados en aromáticas aún es inexistente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunas autoridades ambientales y de salud han establecido niveles permitidos de Pb y Cd en algunos vegetales. Para el Pb hay un límite establecido de: 0.01mg / kg para vegetales *Brassicaceae*, vegetales de bulbo, vegetales de leguminosas, raíces y tubérculos, 0.03 mg / kg para vegetales de hoja y 0.05 mg / kg para vegetales de frutas. Para el Cd hay un límite establecido de 0,01 mg / kg para legumbres vegetales, raíces y tubérculos, tallos y brotes vegetales, 0.02 mg / kg para vegetales de hoja y 0,05 mg / kg para vegetales *Brassicaceae*, vegetales de bulbo y fruta. Para el Hg y el As no existen límites permisibles, aunque diferentes estudios han reportado bioacumulación de estos elementos en plantas comestibles lo que acentúa la importancia de regular los límites máximos permisibles.^{30,31}

El proceso de bioacumulación de metales pesados en plantas y los efectos de Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, pb²⁺ y Zn²⁺ ha sido ampliamente estudiado³², aunque se desconocen los mecanismos moleculares implicados en los procesos de absorción, translocación y bioacumulación.³³⁻³⁵

El Cd es un metal de transición ubicado en el grupo 12 y el período 5 en la tabla periódica. Tiene un número atómico 48 y un peso atómico 112,411u. Este elemento químico se encuentra frecuentemente presente en suelos agrícolas a causa de la deposición atmosférica, la fertilización y el uso de aguas residuales.³⁶ Químicamente se disuelve en el agua contenida en los suelos, se adsorbe en superficies orgánicas e inorgánicas formando parte de minerales, se precipita con otros compuestos del suelo y se incorporan a estructuras biológicas.³⁷ El Cd ingresa a las plantas en su forma divalente Cd²⁺ por las raíces, luego es transportado por el xilema y finalmente se almacena en las hojas o en algunos órganos de las plantas.^{4,34,38}

El Cd a bajas concentraciones puede producir daños fisiológicos, en el aparato fotosintético, transpiración y apertura del estoma. Efectos morfológicos como clorosis, laminación de las hojas, lesiones necróticas, marchitez, inhibición de plantas cultivadas, biomasa reducida, desequilibrios de actualización de agua,

desequilibrio en los sistemas de nutrientes, inhibición de la replicación del ADN, inhibición bioquímica de enzimas involucradas en la fijación de CO₂, sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibición de actividades enzimáticas antioxidantes, oxidación de proteínas son otras consecuencias derivadas de la exposición al Cd.^{36,39-42}

La correlación entre macronutrientes y micronutrientes es un tema de gran interés en la investigación porque nos permite comprender el proceso de translocación de metales en las plantas, identificar cambios morfológicos en relación con un elemento específico.

El contenido de este capítulo está orientado a identificar la bioacumulación de Cd en plantas de albahaca y comprender la influencia de este elemento en la concentración de los macronutrientes Ca, Mg, y K así como los micronutrientes Fe, Mn y Zn en los diferentes tejidos, específicamente raíz, tallo y hoja. Para el desarrollo del estudio, inicialmente se hace una preselección de 4 especies vegetales (espinaca, hierbabuena, albahaca y zanahoria) las cuales son expuestas a diferentes metales (Hg, As, Cd y Pb). Después se realiza análisis de absorción atómica y se selecciona la planta y el metal de interés. Luego se procede a evaluar el lugar de bioacumulación del metal en la planta seleccionada, se determina el factor de bioacumulación (*BCF*), el factor translocación (*FT*) y finalmente se realiza un análisis ANOVA no paramétrico Kruskal Wallis para determinar la influencia del Cd en la translocación de macronutrientes y micronutrientes en las plantas. Con la información obtenida tanto teórica como experimental, se propone un modelo de transporte y bioacumulación del Cd en albahaca, el cual permite establecer criterios útiles para el diseño y confección de protocolos y sistemas de detección de este metal pesado en plantas como la albahaca. Este estudio es de gran interés en el desarrollo del trabajo de investigación porque permite proponer un modelo de transferencia y bioacumulación, así como identificar parámetros de interés para el desarrollo del protocolo del sensado.

4.2 TRANSPORTE Y BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN PLANTAS

4.2.1 Generalidades

Las plantas requieren componentes esenciales para su desarrollo y crecimiento. Tales componentes reciben el nombre de macronutrientes y micronutrientes, los cuales son incorporados desde el sustrato de cultivo (suelo o agua) hacia el interior de la planta, en donde son almacenados y distribuidos a diferentes compartimientos celulares de los diferentes órganos vegetales.

Algunos nutrientes son considerados elementos esenciales porque están directamente relacionados con funciones de crecimiento y reproducción. No pueden ser reemplazados por otros elementos para el cumplimiento de sus funciones. La deficiencia de alguno de estos elementos dentro de la planta se evidencia por medio de cambios morfológicos tales como variaciones en el color de las hojas, marchitamiento, clorosis, necrosis, entre otros.

Los nutrientes minerales se incorporan en la planta en forma de iones inorgánicos. Estos elementos son absorbidos por las raíces y distribuidos a las diferentes partes de la planta con el objetivo de cumplir con las funciones metabólicas correspondientes. Los elementos esenciales se clasifican en micronutrientes y macronutrientes de acuerdo con su concentración relativa en el tejido vegetal. Se estima, por ejemplo, que la

concentración de un macronutriente es de 1g por Kg de materia seca, mientras que para un micronutriente se estima 100mg por Kg de materia seca. Los nutrientes minerales se clasifican en cuatro grupos de acuerdo con su función bioquímica: i) Nutrientes que forman parte de compuestos orgánicos. En este grupo se encuentra el nitrógeno (N) y el azufre (S). ii) Los nutrientes empleados para el almacenamiento de energía o integridad estructural. En este grupo se encuentran el fósforo (P), el silicio (Si) y el boro (B). iii) Los nutrientes que permanecen en forma iónica, tales como K, Ca, Mg, Cl, Mn y Na. iv) Nutrientes implicados en reacciones redox, tales como el Fe, Zn, Cu, Ni y molibdeno (Mo).⁴³ Otro tipo de elementos como Hg, As, Cd y Pb no cumplen ninguna función esencial y su presencia en pequeñas cantidades puede afectar procesos fisiológicos y morfológicos en la planta como resultado de la toxicidad de estos elementos. A nivel celular, la presencia de estos elementos puede: bloquear la producción de enzimas y polinucleótidos, afectar el transporte de iones esenciales, producir inactivación de proteínas y alteración de membrana celular u organelos.⁴⁴

4.2.2 Transporte de solutos a través de la membrana

El transporte de iones al interior de la planta se realiza a través de la membrana plasmática, también denominada *plasmalema*. La membrana plasmática se encarga de controlar el paso de moléculas con carga o sin carga (p.ej. sacarosa) al interior y exterior de la célula mediante una serie de proteínas de transporte que permiten: incorporar y acumular nutrientes al interior de la célula, excluir sustancias tóxicas e intervenir en respuestas a estímulos hormonales y medioambientales.

La permeabilidad es una característica de la membrana que retiene o permite el ingreso de una sustancia a través de ella. La permeabilidad depende de las propiedades químicas del soluto, de la composición lipídica de la membrana y de las proteínas transportadoras que facilitan el ingreso de solutos al interior de esta. Las moléculas pueden atravesar la membrana sin necesidad de emplear una proteína transportadora ya que son solubles en la bicapa lipídica (moléculas lipofílicas). El proceso se define como difusión simple, mientras que la difusión facilitada se refiere al proceso mediante el cual, los solutos requieren proteínas de transporte para permitir el ingreso de determinadas moléculas al interior de la célula.

Cuando existe una diferencia de concentración en ambos lados de la membrana, los iones pueden moverse a favor de un gradiente de concentración ∇eq , es decir, el movimiento se produce de un lugar de mayor concentración hacia un lugar de menor concentración, o en contra de este gradiente de concentración. En la medida que los iones con carga eléctrica ingresan al interior de la membrana, se produce una diferencia de cargas eléctricas o diferencia de potencial a ambos lados de la membrana el cual recibe el nombre de *potencial de membrana*. La combinación de estas dos fuerzas se define como gradiente electroquímico (∇eq) y determina las direcciones de transporte energéticamente favorables de una molécula cargada a través de una membrana.

El transporte de solutos puede ser de tipo pasivo o activo tal como se ilustra en la **Figura 1**. El transporte es pasivo, cuando: i) el ión se mueve a favor del gradiente de concentración ∇eq . ii) El movimiento de solutos involucra difusión simple, difusión facilitada y osmosis. iii) Las proteínas de transporte que intervienen en este proceso son *transportadores* y canales iónicos. De otra parte, el transporte activo se caracteriza por: i) Movimiento de solutos en contra del ∇eq . ii) Se requiere energía para mover el soluto en contra del ∇eq . iii) Las proteínas de membrana utilizan energía celular para movilizar los solutos de un lado a otro de la membrana. El transporte pasivo se divide en dos categorías: transporte activo primario y transporte activo secundario. El transporte primario emplea energía metabólica para el transporte de solutos, mientras que el secundario extrae la energía del ∇eq creado por proteínas transportadoras de iones que bombean iones de un lado a otro en el interior de la membrana. Existen además bombas conformadas por proteínas con-

transportadoras de tipo *simporte* que corresponde a dos moléculas transportadas en la misma dirección y *antiporte* conformadas por dos moléculas transportadoras en diferente dirección.

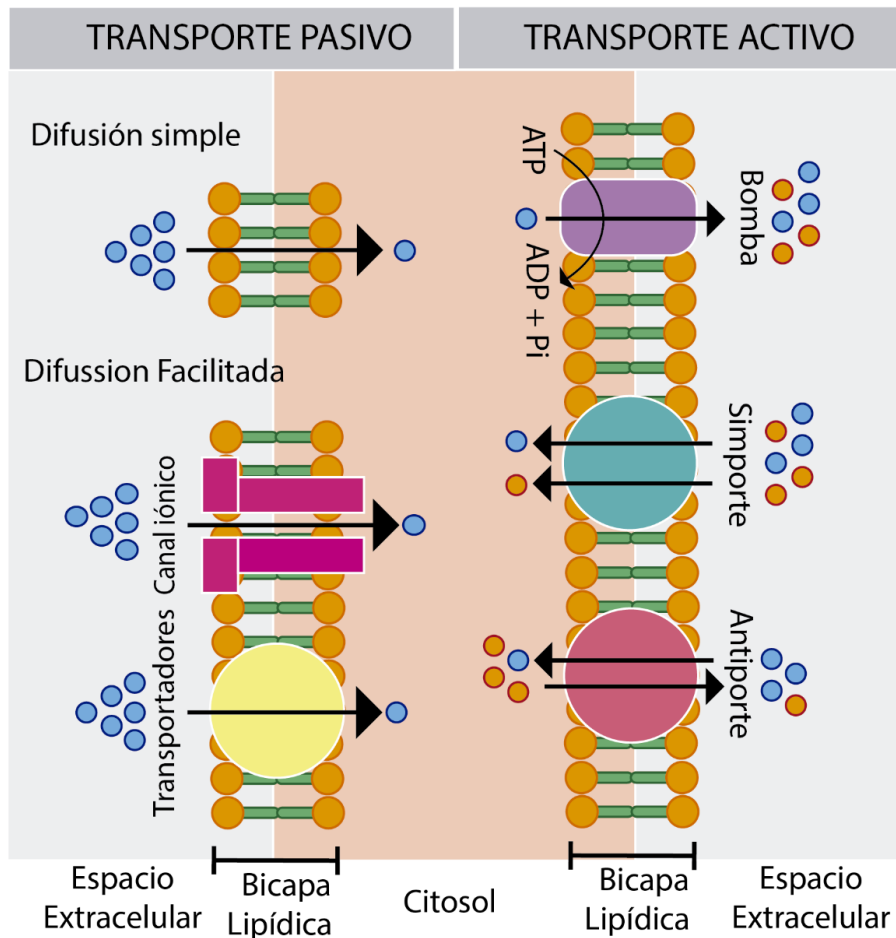


Figura 1. Tipos de transporte y proteínas transportadoras. Adaptado de [46]

4.2.3 Proteínas de transporte

Canales iónicos. Son proteínas que no requieren energía para el transporte de iones y actúan como poros que permiten el transporte de solutos impulsados por sus gradientes electroquímicos. Se encuentran en el tonoplasto, el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana interna del cloroplasto y la membrana tilacoidal. Los canales iónicos no se unen al soluto, forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana permitiendo el pasaje de iones, por esta razón, la velocidad de transporte es mayor que en los *transportadores*. Los canales iónicos son altamente selectivos con la carga y tamaño del ion. El flujo de iones en estos canales es discontinuo porque las compuertas se abren y se cierran como respuesta a ciertos estímulos, tales como modificaciones del potencial de membrana (V_m), unión de ligandos extracelulares y presencia o ausencia de ciertas moléculas, tales como neurotransmisores, *ATP* u otros iones.

Transportadores: Son proteínas de membrana que se adhieren a un soluto del medio acuoso, lo translocan y lo liberan al otro lado de la membrana siguiendo un gradiente de concentración electroquímico. Son conocidos con el nombre de cotransportadores. La velocidad de transporte se encuentra en un rango de 10^2 -

10⁴ molec/s. Estas proteínas pueden ser de tipo: *Uniporte*, cuando transportan un soluto a través de la membrana en una determinada dirección y *simporte* cuando transportan dos solutos en direcciones opuestas. El mecanismo de transporte de estos *transportadores* se produce si proteína tiene unos sitios de unión mediante los cuales se adhiere el soluto a transportar. Cuando el soluto se adhiere, la interacción produce un cambio conformacional en la estructura de la proteína. Este cambio expone el sitio de fijación del soluto al otro lado de la membrana, lo cual permite la translocación y finalmente libera el soluto y vuelve a su estado inicial. Investigaciones recientes consideran que la adherencia del soluto a la proteína se debe su estructura terciaria o cuaternaria en relación con la disposición espacial de los distintos grupos funcionales que determinan la interacción con los diversos ligandos.

Bombas o ATPasas: Son enzimas que acoplan la hidrólisis o síntesis de *ATP* al movimiento de un soluto a través de la membrana. Se han identificado en el transporte de iones monovalentes tales como Cu⁺ y Ag⁺ y iones divalentes tales como Ca²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺ y otros metales pesados.⁴⁵ Estas proteínas se clasifican en tres grupos notados como Tipo *F*, *P* y *V* teniendo en cuenta su composición proteica, localización celular y mecanismo de acción tal como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tipos ATPasas en la membrana celular. Tomado de 46

Propiedad	Tipo P	Tipo F	Tipo V
Función	Están compuestas por una subunidad catalítica -α que es fosforilada como parte del ciclo de transporte	Utilizan la energía de una concentración de H ⁺ o un ∇eq para sintetizar ATP	acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de protones en contra del gradiente de concentración y mantienen bajo el pH de las vacuolas
Localización	Membrana plasmática	Membrana del tilacoide y los cloroplastos	Tonoplasto
Iones transportados	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	H ⁺	H ⁺

En el grupo de tipo *P* se encuentra la familia de **transportadores ABC**, proteínas que se han identificado en plantas tales como la arábida, arroz, maíz, trigo y son responsables de la absorción y distribución de algunos metabolitos, xenobióticos y metales pesados tales como el Zn Mn y Cd.⁴⁶⁻⁴⁸ Los transportadores *ABC* también están relacionados con la respuesta de estrés por Cd en las plantas, por ejemplo, el transportador *AtPDR8* se encuentra ubicado en la membrana plasmática y se encarga de la salida de Cd²⁺ de las células epidérmicas de la raíz.^{49,50}

4.2.4 Bioacumulación de metales pesados en plantas

4.2.4.1 Absorción radical

El ingreso de metales al interior de la planta se puede dar por absorción foliar o radical, ya sea por medio de las células de la raíz o por la cutícula de la hoja. Una vez dentro de las células, estos iones son secuestrados por ligandos tales como fitoquelatinas, metalotioneinas o quelantes a base de cisteína y posteriormente son compartimentalizados en diferentes organelos de la planta. Aunque algunos tipos de transportadores permiten la salida de los ligandos con iones metálicos los cuales se transportan vía xilema o floema, de acuerdo con el mecanismo de ingreso, llegan finalmente a diferentes partes de la planta. El proceso de translocación, secuestro y compartimentalización de metales pesados en la planta es un tema vigente de estudio del que aún se desconocen mecanismos y procesos moleculares de transporte tales como: tipo de transportadores

que permiten el ingreso y la translocación de diferentes clases de metales en las plantas, mecanismos de transporte y procesos de compartimentalización entre otros.⁵¹⁻⁵³

4.2.4.2 Absorción foliar

La absorción foliar de metales pesados en plantas depende de las características físico-químicas de la cutícula y metales, la morfología y superficie de área de las hojas, las formas físicas y químicas de los metales absorbidos, textura superficial de las hojas (pubescencia y rugosidad), hábitat de la planta, duración de exposición, condiciones ambientales e intercambio de gases.⁵⁴

Las plantas muestran diferentes capacidades de absorción y retención foliar. Esto se debe a que la absorción de metales pesados en la planta varía de acuerdo con algunos parámetros de la hoja tales como: estructura del follaje, ángulo de inclinación, densidad, parámetros anatómicos y morfológicos, características de estructura y área. Según lo reportado por Shahid 2017⁵ el ingreso de metales pesados a la planta desde la parte aérea es un proceso del que se resaltan cuatro pasos específicos: Adherencia a la cutícula, penetración a través de la cutícula vía endocitosis, absorción por las células subyacentes y compartimentalización⁵⁴. El proceso se muestra en la **Figura 2** y se describe a continuación.

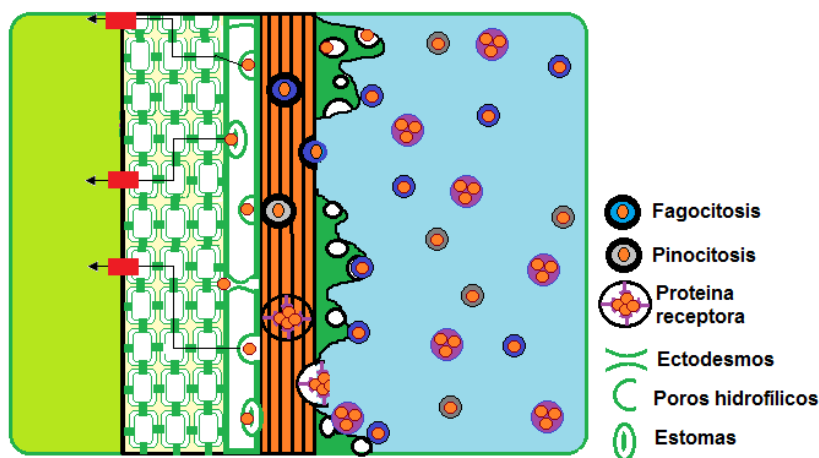


Figura 2. Absorción foliar de metales pesados. elaborado por el autor

Adherencia a la cutícula. El material particulado en el aire contiene metales que son generalmente atrapados por la cera cuticular y se difunden hacia las hojas. Los componentes solubles interactúan directamente con la cutícula, la cual es una capa cerosa que confiere una característica de hidrofobicidad a la superficie de la hoja (El grado de polaridad e hidrofobicidad de la superficie de las hojas varía con la especie de la planta). La deposición de metales pesados en las hojas se refiere a tres mecanismos: químico, físico y biológico. La absorción física se refiere a captura mecánica de metales pesados contenidos en el material particulado por el follaje, teniendo en cuenta las características físicas de vegetación. Los factores químicos o biológicos para tener en cuenta están asociados a la retención y deposición de metales por la cutícula de la planta, la permeabilidad de la cutícula y la absorción de metales pesados en las hojas de las plantas.

Penetración a través de la cutícula, vía endocitosis. Los metales pueden penetrar la cutícula por dos rutas: i) La lipofílica en la cual, las sustancias se difunden a través de la cutícula. ii) la hidrofílica donde las sustancias penetran la cutícula por los estomas y poros acuosos de la cutícula. La penetración por las estomas es más fácil debido a que el tamaño de las células subcelulares es mucho más pequeño. El factor de penetración depende de la madurez de las hojas y las condiciones ambientales.

Absorción por las células subyacentes. Después de la penetración, los metales son generalmente transportados por transporte activo vía simplasto. El transporte activo de metales pesados dentro de la planta depende de procesos bioquímicos y metabólicos de la planta.

Compartimentalización. Después de que los metales ingresan al interior de la planta son inmovilizados por quelatos o compuestos orgánicos presentes en el floema los cuales inhiben su precipitación. Dentro de los mecanismos de defensa, la planta cuenta con transportadores que limitan la acumulación en tejidos y permiten el secuestro de metales pesados dentro de organelos como la vacuola. Al igual que en la absorción radical, los transportadores que intervienen en la Compartimentalización no han sido identificados en su totalidad.

4.2.5 Efectos fisiológicos de Metales pesados en plantas

Los efectos fitotóxicos, varían de acuerdo con el tipo de metal, específicamente para metales como el Hg, As, Cd y Pb.⁸ A continuación, se describen los efectos fisiológicos y morfológicos en plantas.

Mercurio: El Hg se encuentra en la atmosfera en su forma elemental Hg⁰ e inorgánica Hg², el cual puede ser depositado sobre lechos de agua, suelo y vegetación. Se libera al ambiente por fuentes naturales y antropogénicas. Las emisiones naturales se liberan desde la litosfera hacia la atmosfera en bajas concentraciones, mientras que las fuentes antropogénicas son el resultado de diferentes industrias que utilizan el Hg como materia prima para llevar a cabo el desarrollo de ciertas actividades en la extracción o producción de diferentes elementos.^{55,56} Según lo reportado por Mahbub⁵⁵ el 83.45% de las emisiones de Hg en el ambiente son producto de industrias tales como combustibles fósiles, producción de metales no ferrosos, producción de soda caustica y minería de oro.⁵⁵ En el caso específico de las plantas no se conoce mucho sobre el proceso de absorción y translocación, se infiere que los mecanismos de entrada están asociados a la deposición de material particulado con iones de Hg sobre la superficie de las hojas y al uso de herbicidas y fungicidas.^{5,24,44,57} El Hg es fitotóxico debido a que afecta la integridad de la estructura de la membrana celular, incrementa la peroxidación lipídica, reduce la estabilidad del ADN y afecta mecanismos enzimáticos.⁵⁸ De acuerdo a Miranda y carranza⁸ las plantas expuestas a Hg presentan cambios morfológicos tales como reducción del área foliar, clorosis, necrosis foliar y aparición de manchas pardo-rojizas en tallos.

Arsénico. El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la atmosfera, en la hidrosfera y en la biosfera, el cual está presente en cuatro estados de oxidación -3, 0, +3 y +5. Según Clemens³⁴ el arsénico se puede presentar en las plantas como arsenato As(V), arsenito As(III) y especies metiladas de As(V) por bacterias presentes en la rizosfera y por la biotransformación que sufre el elementos durante el proceso de absorción y translocación al interior de la planta. La absorción de cada especie depende del tipo de transportador, por ejemplo: el As(V) se lleva a cabo por transportadores que son químicamente afines a macronutrientes de fosfato (*PTs*), mientras que para el As(III) se han identificado los transportadores *Lsi1* y *OsNIP2;1* o canales de Silicio. La diferencia de transportadores se debe a que el arsenito tiene un tamaño molecular y una estructura similar al ácido silícico.^{48,59} En el proceso de translocación, también se han identificado transportadores *ABC* (*AtABCC1*, *AtABCC2*) que permiten la compartimentalización de fitoquelatinas quelantes de As(As-PC) al interior de la vacuola. Los transportadores *Lsi2* permiten el paso de

especies de arsénico tales como As(III), DMA y MMA al xilema de la planta.³⁴ Con respecto a plantas hiperacumuladoras se han identificado especies de helechos tales como *brake fern* y *pteris Vittara*.^{3,60} El arsénico induce problemas de inhibición en el crecimiento de las raíces y necrosis, se cree que la causa deriva en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la biotransformación del arsénico en la planta.^{3,34,48,59,61}

Cadmio. El Cd es un elemento que se encuentra en suelos, agua y atmosfera.⁶² Químicamente se encuentra disuelto en agua contenida en suelos. Es adsorbido en superficies orgánicas e inorgánicas formando parte de minerales, es precipitado con otros compuestos del suelo e incorporado a estructuras biológicas.³⁷ El Cd ingresa a las plantas en su forma divalente Cd²⁺ por las raíces, luego es transportado por el xilema y finalmente es almacenado en las hojas o en algunos órganos de las plantas.^{4,38,48} Entre las proteínas responsables de la entrada de Cd a la célula se destaca el transportador específico de calcio *LCT1* y la proteína *IRT1*, perteneciente a la familia de transportadores de Zn y Fe (*ZIP*) y la familia de transportadores Nramp (*Natural resistance-associated macrophage protein*) localizada en el interior de la vacuola. En el trigo la *IRT1* es la proteína transportadora de Ca²⁺ y media la captación de Na⁺ y Cd²⁺.⁶³ Se estima que la tasa de transferencia del Cd en la planta se deriva de la concentración de Cd en el suelo y de las propiedades del mismo, tales como pH, potencial redox, temperatura, contenido de arcillas, materia orgánica y agua, porcentaje de carbón y Zn.^{4,37} La toxicidad del Cd interfiere negativamente en las plantas cuando se presenta en altas concentraciones, ya que influye en la: inhibición del crecimiento, activación o inhibición de enzimas, reducción de la tasa de transpiración y contenido de agua, interfiere en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua provocando severos desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta.^{37,38,45,64} Según lo reportado por Rizwan⁶⁵ las altas concentraciones de Cd en vegetales: incrementa el número de ROS (especies reactivas de oxígeno), causa genotoxicidad, y genera daños en el DNA.

Plomo. El Pb es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza. Se introduce por actividades antropogénicas tales como minería, manufactura industrial, quema de combustibles fósiles, agricultura, fundición de metales y otras actividades urbanas.^{8,66} Actualmente se sabe que el Pb se enlaza a grupos carboxilos en la raíz, pero se desconocen transportadores que influyen en la absorción, translocación y compartimentalización. Según se ha reportado⁶⁶, la bioacumulación depende del tipo de especie. Así por ejemplo, especies como *Allium cepa*, *H. vulgare* y *Z.mays* son tolerantes al Pb, mientras que especies como *Brassica napus* y *Phaseolus vulgaris* experimentan toxicidad. El exceso de Pb en plantas puede inhibir la germinación, retardar el crecimiento, afectar la síntesis de clorofila, afectar y causar desequilibrios nutricionales en tejidos de la planta.^{8,66}

4.2.6 Metales pesados en plantas aromáticas y Normatividad

Según la CAR, el 26% de actividades agrícolas, pecuarias e industriales se desarrolla a lo largo de la ribera del río Bogotá. La producción de hortalizas en la Sabana de Bogotá es una de las principales actividades agrícolas desarrolladas en la zona y el uso de agua del Río Bogotá para actividades de riego es un problema vigente debido a la cantidad de contaminantes presentes en los vertimientos que se introducen en el cauce del río. La presencia de metales pesados tales como Hg, As, Cd y Pb ha sido reportado por la comunidad académica de la Ciudad y algunos periódicos como lo reportado en estudio publicado en 2009^{67,68} por investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Se evidenció que algunas hortalizas regadas con agua del Río Bogotá superan los límites máximos permisibles (ver **Tabla 2**) de Hg, As, Cd y Pb en productos tales como apio, lechuga, repollo y brócoli. Por lo tanto, la presencia de metales en suelos, pastos y cultivos se debe al uso inadecuado de aguas contaminadas para actividades de riego que a su vez afectan la inocuidad de productos como hortalizas, carne y leche con fines de consumo humano.^{8,12}

Tabla 2. Límites máximos permisibles de concentración de Cd y Pb en hortalizas, según legislación del Codex alimentarius 193-1995 y Unión Europea (UE) 2017.^{69,70}

Alimento	Unidades	Cd	Pb
Hortalizas de bulbo	mg/kg	0.05	0.1
Raíces y tubérculos		0.01	0.1
Hortalizas de fruto		0.05	0.1
Hortalizas de hoja		0.02	0.3
Legumbres		0.01	0.1
Tallos y vegetales de hojas		0.01	-

Para el caso específico de plantas aromáticas, la presencia de metales pesados no ha sido reportada en Colombia. Sin embargo, existe la posibilidad de encontrar estos contaminantes en diferentes trazas, debido a la falta de regulación y monitoreo de estos productos que son distribuidos en las diferentes plazas de la ciudad de Bogotá⁷¹. Según un informe presentado por el Ministerio de agricultura en 2016⁷² de 100 a 243 plantas aromáticas son vendidas en las plazas de mercado de la ciudad de Bogotá, sin embargo, el subsector de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines presenta una carencia en la caracterización de calidad debido a la informalidad de las operaciones de comercio.

Según lo reportado por Esetili¹¹ los cultivos de plantas aromáticas también presentan altos índices de contaminación por metales pesados, principalmente en escenarios donde no se regulan las condiciones de inocuidad del producto. En algunos de los productos que llegan a tiendas o cadenas de mercado de marcas seleccionadas que tienen condiciones de cultivo altamente tecnológicas, se han detectado concentraciones de metales pesados. Así, en el trabajo de investigación realizado por Hµgret⁷³ de una selección de 36 bolsas filtrantes de té, té verde, anís, manzanilla y cedrón o hierba luisa, expedidas en Lima por diferentes marca, mediante análisis de espectrofotometría de absorción atómica y generación de hidruros se determinaron concentraciones de metales tales como Hg, As, Cd y Pb entre otros, los cuales comparados con límites internacionales se encontró que las bolsas presentaban metales pesados, aunque en bajas concentraciones según los límites establecidos por la OMS, la Farmacopea europea y el Codex Alimentarius (Ver **Tabla 3**). En países como África, Brasil, Estados Unidos, se han reportado la presencia de metales pesados en plantas aromáticas que se cultivan en suelos contaminados o en zonas de alta exposición. Preocupa el uso de especies contaminadas para fines medicinales.⁷⁴⁻⁷⁸

Tabla 3. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados en bolsas filtrantes para infusión. Valores tomados de Hµgret.⁷³

Institución	Unidades	Hg	As	Cd	Pb
Farmacopea Europea	µg/g	0,1	-	0,5	5
Codex Alimentarius		-	0,2	0,2	-
Organización mundial de la salud (OMS)		-	-	0,3	10

4.3 IDENTIFICACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

De acuerdo con la metodología planteada para la realización del presente trabajo, se requiere identificar las plantas de las que se debe escoger el *objeto de estudio*, es decir la planta sobre la cual se va a realizar el estudio de transferencia, bioacumulación y sensado. Los criterios para la escogencia de estas plantas fueron los siguientes:

1. Que tengan suficiente relevancia en la economía y uso comercial y alimenticio en la sabana de Bogotá, esto en respuesta al compromiso adquirido con el Distrito Capital respecto a atender una problemática de valor para la comunidad de la región.
2. Plantas cultivadas en la Sabana de Bogotá.
3. Como producto de la vigilancia científico-tecnológica, escoger plantas con potencial capacidad de bioacumulación de metales pesados.

Para el estudio correspondiente, se seleccionaron los siguientes metales pesados y metaloide: Cd, Hg, Pb, As. Esta selección se basa en el impacto que estos metales y metaloides tienen en el medio ambiente y en su potencial impacto causado en los cultivos de la región. De estos cuatro metales, solamente se selecciona el de mayor grado de acumulación en la planta objeto de estudio.

El estudio se realiza en dos ambientes de cultivo: en tierra y en agua. En tierra, se garantizan condiciones similares a las que se presentan *in Situ*. De otra parte, en agua, siguiendo el método de raíz flotante, un estudio sistemático y de mayor control se hace posible. Una evaluación comparativa de estos dos ambientes va a permitir establecer criterios para la escogencia de condiciones para un óptimo trabajo y control experimental y toma de mediciones relacionadas con transferencia y bioacumulación.

4.3.1 Materiales y métodos

Como resultado de un estudio de vigilancia científico-tecnológica y por su importancia agrícola y de consumo, se identificaron cuatro especies vegetales para realizar la selección del objeto de estudio. Dos aromáticas: hierbabuena (*Mentha spicata*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) y dos hortalizas: espinaca (*Spinacia oleracea*) y zanahoria (*Daucus carota*). De estas cuatro plantas preseleccionadas, se procedió a investigar su respuesta acumuladora de los metales pesados de interés.

La albahaca (*Ocimum basilicum*) se ha ido popularizando en los últimos años en Colombia debido a sus usos culinarios y medicinales y actualmente se produce en los departamentos de Boyacá (73%), Valle del Cauca (19%), Cundinamarca (6%) y Antioquia (2%), siendo las principales ciudades uno de los lugares de mayor consumo de esta especie. Con respecto a la bioacumulación de Pb y Cd se tienen pocos reportes de bioacumulación.⁷⁹⁻⁸¹

La hierbabuena (*Mentha Spicata*) es muy conocida por sus propiedades culinarias y medicinales. En Colombia se consume principalmente mediante infusiones. Según lo reportado por Bekiaroglou⁸² La hierbabuena puede bioacumular Pb y Zn como resultado de prácticas inadecuadas empleadas durante su producción.

La zanahoria (*Daucus Carota*) es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel nacional e internacional. En Colombia presenta gran demanda y se cultiva en los departamentos de Cundinamarca (39,60), Antioquia (31,98%), Boyacá (17,26%), Nariño (10,91%), Norte de Santander (0,21%) y Santander (0,04%).^{83,84} Debido a su importancia económica, ha sido reportada como bioacumuladora de Cd en grandes cantidades y de otros elementos tales como el pb en menores concentraciones.^{8,85,86}

La espinaca (*Spinacea oleracea L.*). Es una planta de menor consumo en comparación con otros cultivos como el banano, la caña de azúcar, el arroz y la papa en Colombia. Sin embargo se cultiva por pequeños productores que no cuentan con prácticas que les permita mejorar problemas de producción.⁸⁷ Reportes académicos ha sido reportada como hiperacumuladora de Cd.^{37,88}

Una vez preseleccionadas las especies, se procede a realizar los montajes experimentales para cultivo, monitoreo y medición. Estos montajes se realizaron bajo condiciones de invernadero en espacio abierto,

específicamente en el sótano del edificio Lorenzo Uribe de la Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá con coordenadas geográficas 4° 37'47'' N 74° 03'53'' W a una altitud de 2600 m.s.n.m.

4.3.1.1 Exposición de las plantas preseleccionadas cultivadas en tierra a metales pesados Hg, Cd, Pb y al metaloide As

Para el montaje en tierra se emplearon bandejas de siembra de 18 cavidades, bandejas de siembra sin cavidades, 30 plántulas por cada especie preseleccionada: de hierbabuena (*Mentha spicata*), albahaca (*Ocimum basilicum*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y zanahoria (*Daucus carota*) con un tiempo de vida de 4 semanas de siembra. Estas plántulas fueron obtenidas del Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. La tierra negra (15kg) fue abonada con humus de lombriz (2kg), fertilizante triple 15 (500g), mientras el sistema de riego fue por goteo tal como se indica en la **Figura 3**.



Figura 3. Cultivo en tierra de especies preseleccionadas

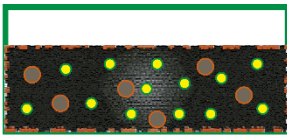
El procedimiento de siembra, observación y selección se muestra en la **Figura 3**.

Se realizó mezclado homogéneo de la tierra negra (15kg) con el humus de lombriz (2kg) y el fertilizante triple 15 (500g), el cual se distribuye en las cavidades de las bandejas.

1. El diseño experimental propuesto fue de bloques al azar con tres repeticiones con cuatro especies, dos tratamientos y un control. Por cada bloque se emplean 10 plántulas de cada especie, las cuales son expuestas a concentraciones de 100 µg/l de Cd mediante implementación del sistema de riego. El riego se realiza cada tres días durante un periodo de dos meses en un periodo comprendido entre julio 2017 y enero 2018. En el periodo de cultivo se hace observación de la evolución de las plantas para identificación de las especies que mejor se adaptan a las condiciones del medio.
2. Se procedió a extracción de plantas y lavado de raíces con abundante agua desionizada.
3. Secado en horno durante 72h a una temperatura de 80°C.
4. Mortero y tamizado de muestras vegetales.
5. Digestión y realización de la caracterización mediante técnica analítica de absorción atómica.

6. Evaluación comparativa entre las plantas preseleccionadas de acumulación de cada uno de los metales pesados y metaloide de interés.

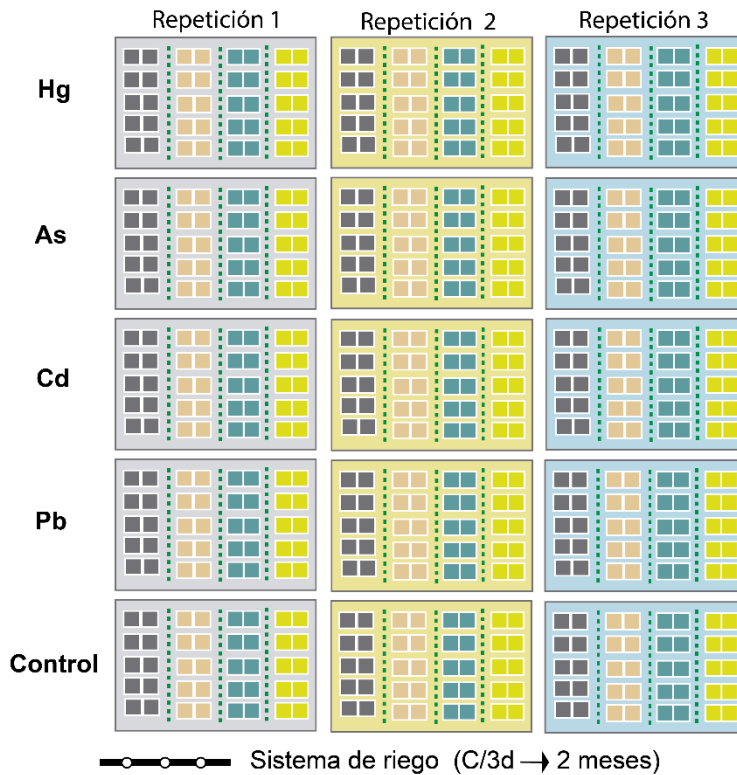
1. Preparación de tierra de cultivo



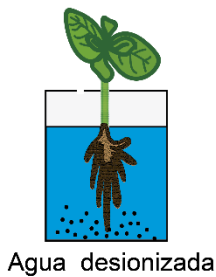
- Tierra negra (15kg)
- Humus de lombriz (2kg)
- Fertilizante triple 15 (500g)

2. Diseño experimental : Diseño de bloques con 3 repeticiones

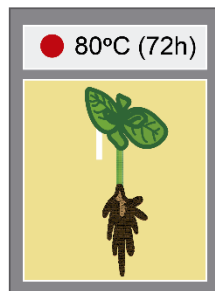
- Albahaca
- Hierbabuena
- Zanahoria
- Espinaca



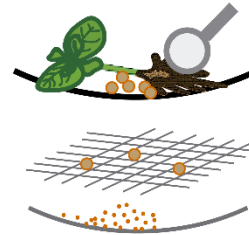
3. Lavado de raíces



4. Secado en horno



5. Mortero y tamizado



6. Digestión y Análisis: Absorción atómica

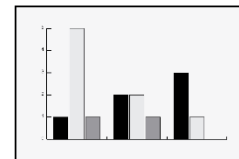


Figura 4. Diagrama metodológico de cultivos realizados en tierra.

4.3.1.2 Cultivo de plantas seleccionadas en agua

Para el montaje en agua se emplearon las especies preseleccionadas siguiendo el método de raíz flotante reportado por Liu.⁸⁹ Para este montaje (ver **Figura 5**) se emplean: plántulas de hierbabuena, albahaca, espinaca y zanahoria, con un tiempo de vida de 4 semanas de siembra obtenidas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Se emplearon botellas de vidrio para la siembra con capacidad de 50ml. El fertilizante líquido utilizado fue de la marca Creclizer con una composición de: N: 200g/l; fosforo asimilable (P₂O₅): 100g/l y potasio soluble en agua (K₂O):100g/l a una concentración de 10ml/l. La siembra se realizó utilizando espuma industrial. El metal empleado es el de mayor concentración en el montaje en tierra.

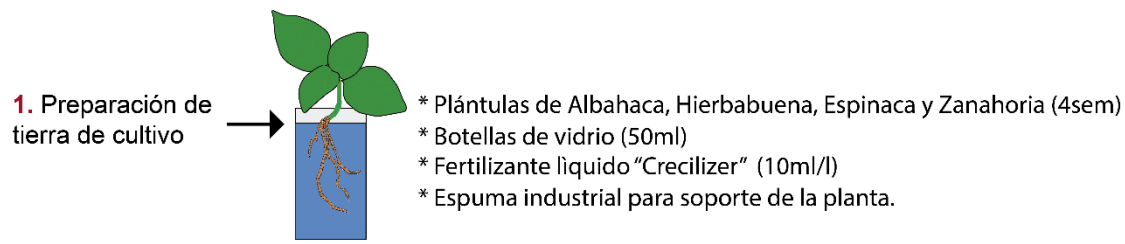


Figura 5. Montaje experimental para cultivo en agua de las plantas preseleccionadas

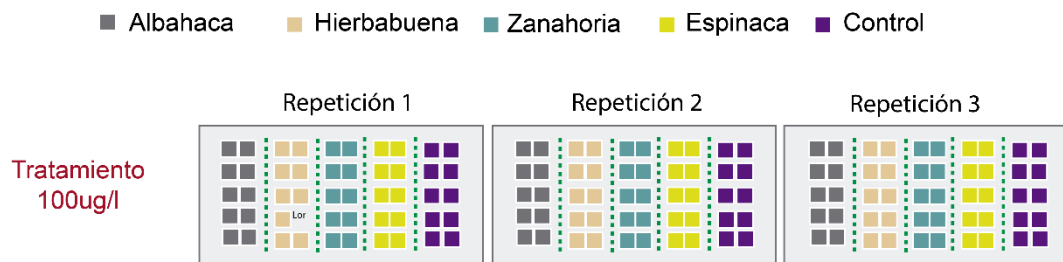
El diseño experimental propuesto fue de bloques al azar con tres repeticiones, cuatro especies, dos tratamientos y un control. Por bloque se emplearon 30 plantas por especie, distribuidas por bloque de la siguiente manera: 10 plantas control, 20 plantas expuestas al metal seleccionado. El procedimiento experimental se organizó de la siguiente manera:

1. Siembra siguiendo el método reportado por Liu⁸⁹ y exposición de las plantas a una concentración de 100µg/l de durante un tiempo aproximado de Hg, As, cd y Pb (cada uno por separado) durante un periodo de 7 días. Esta concentración fue seleccionada de acuerdo con los resultados obtenidos de la siembra en tierra.
2. Registros fotográficos de cambios morfológicos presentados durante el tiempo de exposición y observación de cambios significativos.
3. Extracción y lavado de las plantas con abundante agua desionizada.
4. Secado a 80°C por 72h, tamizado, digestión y análisis mediante técnica analítica de absorción atómica.

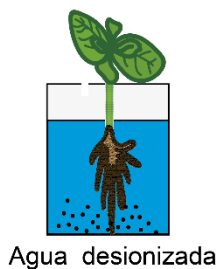
El esquema de desarrollo experimental se muestra en la **Figura 6**.



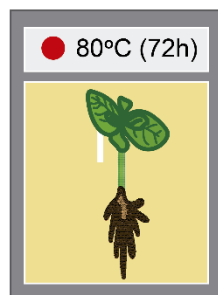
2. Diseño experimental: Bloques con 3 repeticiones



3. Lavado de raíces



4. Secado en horno



5. Mortero y tamizado



6. Digestión y Análisis: Absorción atómica

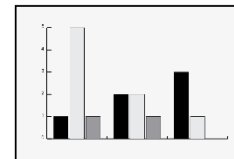


Figura 6. Diagrama metodológico de cultivos de raíz flotante

4.3.2 Análisis de concentración de metales y metaloide en raíz, tallo y hoja en la planta seleccionada como objeto de estudio

El diseño experimental para evaluar la distribución y concentración del metal pesado y la planta seleccionada consistió en bloques al azar con tres repeticiones. Se emplearon tres tratamientos correspondientes a tres concentraciones diferentes 10µg/L, 50µg/L y 100µg/L del metal seleccionado de acuerdo con los resultados del montaje de raíz flotante. El periodo de exposición es de una duración de 8 días y la técnica de análisis para medir concentración en raíz, tallo y hoja se realiza utilizando Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente. Este análisis es realizado en el Laboratorio de aguas de la Pontificia Universidad Javeriana. Las correspondientes caracterizaciones de concentración se obtuvieron para los días 2,4,6 y 8.

4.3.3 Influencia del metal seleccionado en la absorción de macronutrientes y micronutrientes.

Se realizó un análisis Anova no paramétrico Kruskal Wallis con un nivel de significancia de 0.05, y un análisis de comparaciones múltiples Dunn para identificar si las medias de macronutrientes (Ca, Mg, K) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn) son afectados por la exposición al metal seleccionado, en concentraciones de 10µg/l, 50 µg/l,100 µg/l. Esto se realiza en los tejidos de la planta (raíz, tallo, hoja) en los días de siembra 2,4,6 y 8. Los programas estadísticos empleados para los análisis de resultados fueron SPSS y Statistix 10.

4.4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.4.1 Vigilancia Tecnológica

A partir de un estudio de vigilancia tecnológica sobre productividad científica e investigación realizada en bioacumulación de Cd en plantas en general, estudio realizado para una ventana de vigilancia comprendida entre 2011 y 2020, se observa que, a pesar de la reducida cantidad de publicaciones, existe una tendencia de crecimiento en reporte de resultados científicos. La línea de tendencia muestra en la **Figura 7**.

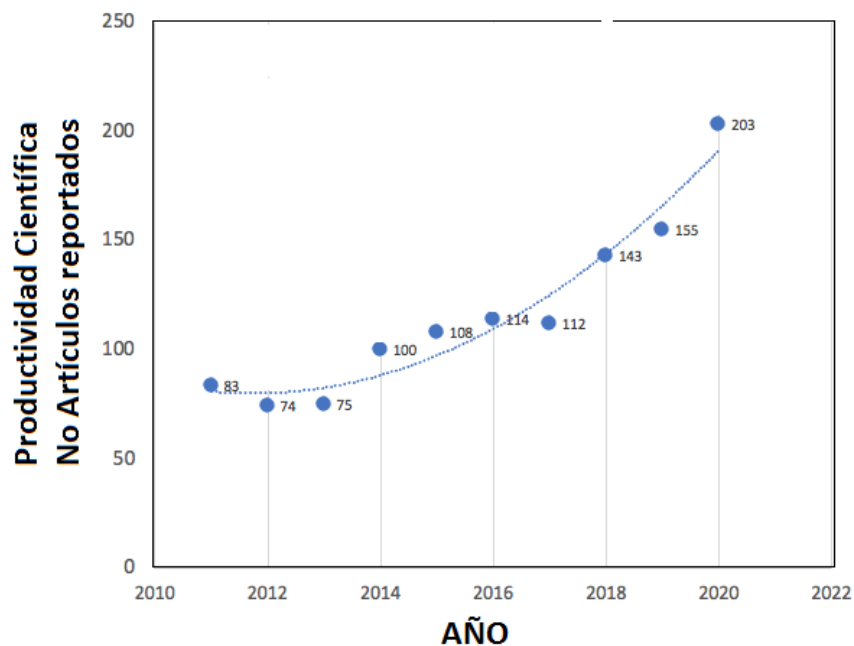


Figura 7. Productividad científica en Cd en plantas en la ventana de los últimos 10 años

En la **Figura 8** se muestra la productividad científica por país. China se destaca por ser el país con mayor investigación en esta problemática, seguido de India y Estados Unidos. En América Latina se destaca Brasil (ocupa el puesto 6 a nivel global). Colombia registra una escasa productividad científica y ocupa el lugar No 46 en productividad científica en esta problemática, a pesar de ser un país con marcada actividad agrícola e importancia de la albahaca en consumo y comercialización. Con respecto a Cd en albahaca, Colombia no

reporta ninguna publicación aún. Los trabajos realizados en Colombia se han orientado a determinación de Cd en cacao y biosorbentes de Cd a partir de residuos agrícolas (ver **Figura 8**). Esto plantea la urgente necesidad de incrementar esfuerzos a nivel Nacional y Local (Sabana de Bogotá) en tareas de monitoreo, diagnóstico e investigación sobre movilidad y bioacumulación de Cd en plantas de consumo humano, aspecto de gran trascendencia para garantizar seguridad alimentaria y calidad de vida.

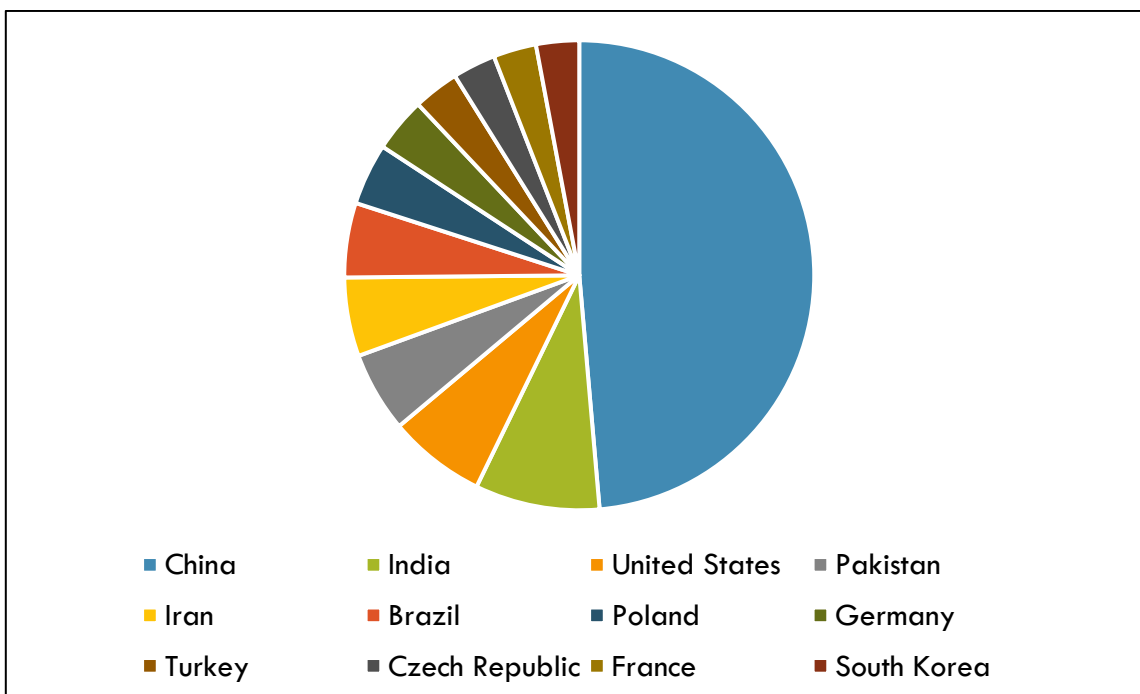
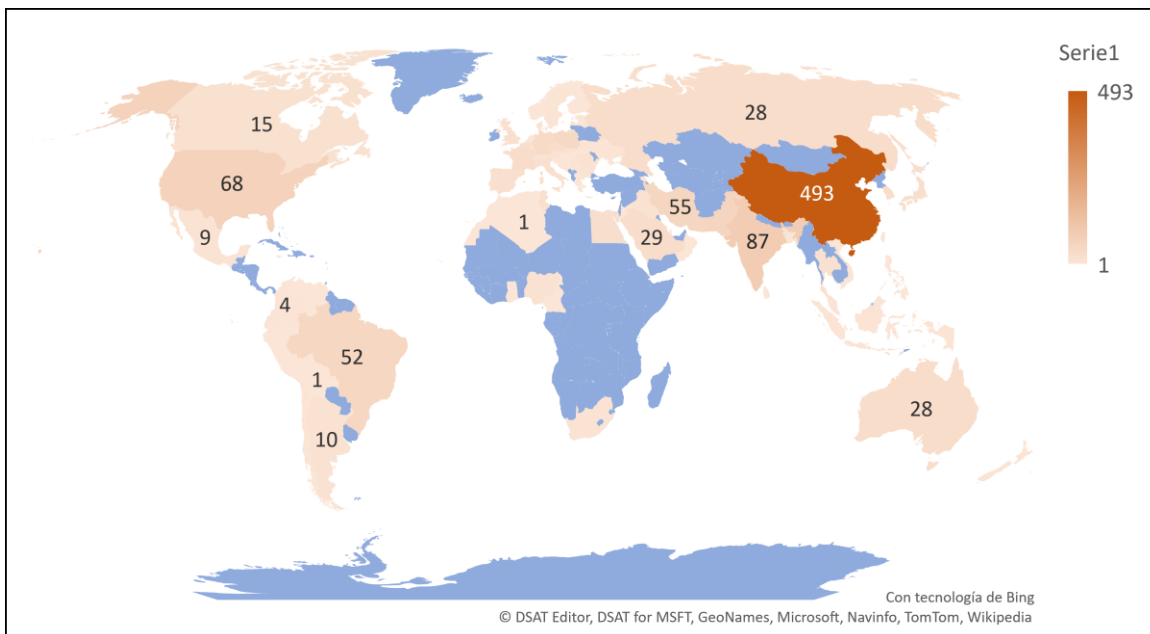


Figura 8. Productividad científica por país relacionada con el problema del Cd en plantas de consumo humano.

4.4.2 Exposición en plantas preseleccionadas cultivadas en tierra con exposición de metales pesados Hg, Cd, Pb y metaloide As

Para el montaje en tierra, las cuatro especies seleccionadas; hierbabuena (*Mentha spicata*), albahaca (*Ocimum basilicum*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y zanahoria (*Daucus carota*), fueron observadas durante un periodo de dos meses (periodo comprendido durante los meses de agosto a septiembre del 2017) con el fin de identificar condiciones de adaptabilidad antes de exponerlas a los metales pesados. Transcurrido este periodo se procedió a realizar el cultivo de las especies seleccionadas con exposición de los metales Hg, Cd, Pb y metaloide As a una concentración de 10µg/l (Exp1). Posteriormente se realizó un nuevo montaje con exposición de los metales y metaloide a una concentración de 100µg/l (Exp2). Los análisis se realizaron en el laboratorio Agrilab S.A, empleando el método analítico de absorción atómica y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de concentración de Hg, As, Cd y Pb en plantas de hierbabuena, albahaca, espinaca, zanahorias expuestas a concentraciones de 10 µg/l (Exp1) y 100 µg/l (Exp2) durante un periodo de dos meses

Exp	Especie	Unidades	As	Hg	Cd	Pb
1	Hierbabuena	mg/kg	N.D	N.D	N.D	N.D
1	Albahaca	mg/Kg	N.D	N.D	N.D	N.D
1	Zanahoria	mg/Kg	N.D	N.D	N.D	N.D
1	Espinaca	mg/Kg	N.D	N.D	N.D	N.D
2	Hierbabuena	mg/kg	N.D	N.D	23.6	N.D
2	Albahaca	mg/Kg	N.D	N.D	60.5	N.D
2	Zanahoria	mg/Kg	N.D	N.D	N.D	N.D
2	Espinaca	mg/Kg	N.D	N.D	N.D	N.D

De los resultados obtenidos se observa que la exposición de las plantas a una concentración de 10 µg/l no registra acumulación del metal correspondiente. Para las plantas expuestas a una concentración de 100µg/l se registran concentraciones de Cd de 23,6 mg/kg para plantas de hierbabuena y 60,5 mg/kg para las plantas de Albahaca. Esta diferencia de acumulación de Cd en estas dos especies está de acuerdo con lo reportado en la literatura en donde se indica que el proceso de bioacumulación es diferente para cada especie vegetal a pesar de compartir las mismas condiciones de cultivo.^{52,79,90} Las variaciones morfológicas en los tejidos de las plantas pueden variar en función del proceso de bioacumulación.

De estos resultados obtenidos, se hace posible identificar a la albahaca como el objeto de estudio, y al Cd como el metal pesado de interés.

4.4.3 Acumulación de Cd en especies preseleccionadas en cultivos de agua

A pesar de que en los resultados obtenidos en el cultivo en tierra no se detecta Cd para las plantas de espinaca y zanahoria, se requiere realizar mediciones de acumulación para todas las plantas en ambiente acuático para garantizar que en estas condiciones se mantiene la preferencia de acumulación en las dos plantas mencionadas. Los resultados obtenidos en esta medición se muestran en la **Tabla 5**, en la cual se indican tres mediciones por cada muestra. El promedio de concentraciones se indica en la gráfica de la **Figura 9**.

Tabla 5. Resultados de concentración de Cd para cada especie vegetal con su respectiva desviación estándar (DS). Los resultados fueron obtenidos por técnica analítica de absorción atómica

	Unidades	R1	R2	R3	promedio	DS
Albahaca	mg/l	0,1004	0,0972	0,1049	0,1008	0,0039
Hierbabuena		0,0731	0,0739	0,0742	0,0737	0,0006
Espinaca		0,0552	0,0579	0,0567	0,0566	0,0014
Zanahoria		0,0446	0,0476	0,0476	0,0466	0,0017

De estos resultados se observa la albahaca alcanza la concentración más alta con una media de 0.1008 mg/l, seguida de hierbabuena 0.0737 mg/l, espinaca 0.0566 mg/l y zanahoria 0.0466 mg/l. De estos resultados se observa que las cuatro especies exceden en las condiciones de cultivo escogidas el límite de concentración recomendado por la OMS para el Cd, el cual se encuentra entre 0,01 mg/l y 0,05 mg /l.⁶⁹

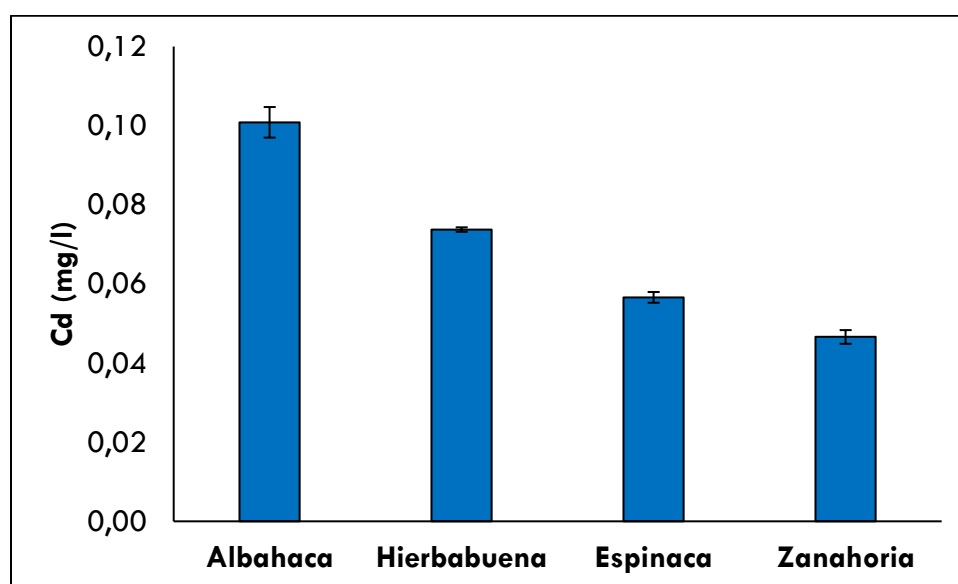


Figura 9. Concentraciones de Cd en plantas de albahaca, hierbabuena, espinaca y zanahoria cultivadas en agua y analizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama directa de acetileno (AAS).

Los resultados obtenidos en los dos tipos de cultivo (tierra y agua) muestran que la albahaca obtiene las mayores concentraciones de Cd y por esta razón se selecciona como objeto de estudio y el Cd como metal pesado de interés.

4.4.4 Bioacumulación

El factor de bioconcentración o bioacumulación (*BCF*), que se define para aire, suelo o agua, es utilizado para medir la capacidad de captación que presenta una planta de un metal pesado presente en su entorno, en términos de la concentración del metal. se define como la relación entre la concentración de metales pesados en la planta y la concentración del metal en el cultivo medio^{91,92}:

$$BCF = \frac{([CC] \text{ elemento})_{planta T_x}}{([CC] \text{ elemento})_{medio T_x}} \quad (1)$$

Donde [CC] es la concentración del elemento en la planta y el medio y T_x representa el tiempo final de exposición.

Para definir a una planta como potencialmente *hiperacumuladora*, se requiere que el BCF sea mayor a 10. Si el BCF es mayor a 1 se suele considerar como *acumuladora*. Si este factor se encuentra por debajo de 1 se define a la planta como *exclusora*.^{44,45,59}

Según los resultados de *BCF* (%) obtenidos según la gráfica de la **Figura 10**, la albahaca registra un BCF ligeramente mayor a 1, lo que la clasifica como *acumuladora* de Cd, mientras que las otras plantas: hierbabuena, espinaca y zanahoria pueden ser clasificadas de acuerdo con este estudio como *exclusoras* ya que el *BCF* es inferior a 1

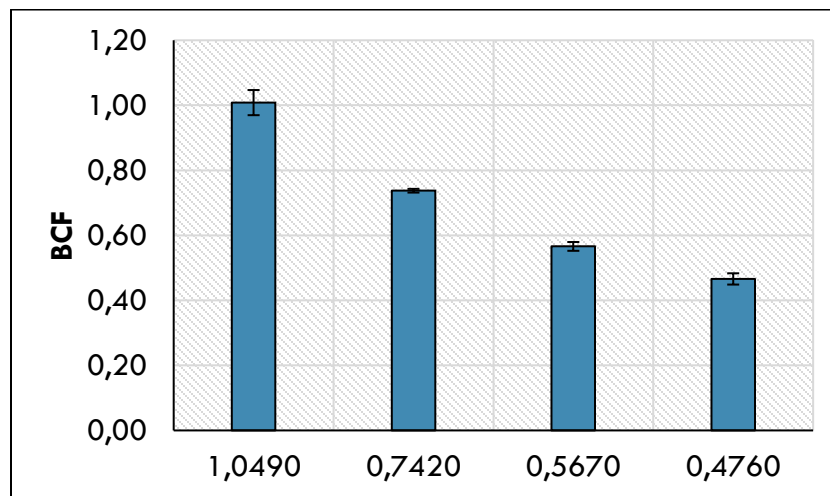


Figura 10. BCF de plantas expuestas a Cd (100µg/l) en agua.

4.4.5 Cambios morfológicos en plantas expuestas a Cd cultivadas en agua

Los efectos fitotóxicos son diferentes según el metal, aunque algunos metales tienen algunas similitudes, por ejemplo, Cd y As son altamente tóxicos y su bioacumulación en la planta que está relacionada con las propiedades del medio de cultivo, genera alteraciones fisiológicas, variaciones morfológicas y disminución en los rendimientos. Así, el estrés por Cd en las plantas muestra efectos visibles como inhibición del crecimiento, manchas oscuras en la punta de la raíz, pigmentos amarillos en las hojas, clorosis y necrosis.^{48,93}

Para el cultivo realizado en agua y en tierra, todas las plantas presentaron cambios morfológicos como se muestra en las fotografías de la **Figura 11**. Fotografías de plantas expuestas a Cd (100µg/l) tomadas durante los días 1,3,5 y 7.

Las plantas de hierbabuena mostraron signos de marchitez, pérdida de turgencia, manchas necróticas en las hojas de las puntas y manchas oscuras en la punta de la raíz. La albahaca presentó pérdida de expansión foliar, curvatura y muerte. En las espinacas se observó enrollamiento y pérdida de turgencia en las hojas. En la

zanahoria se observó marchitez, manchas necróticas en las puntas de las hojas y pudrición suave. A partir del día 5 se observan efectos significativos en cada una de las especies vegetales.

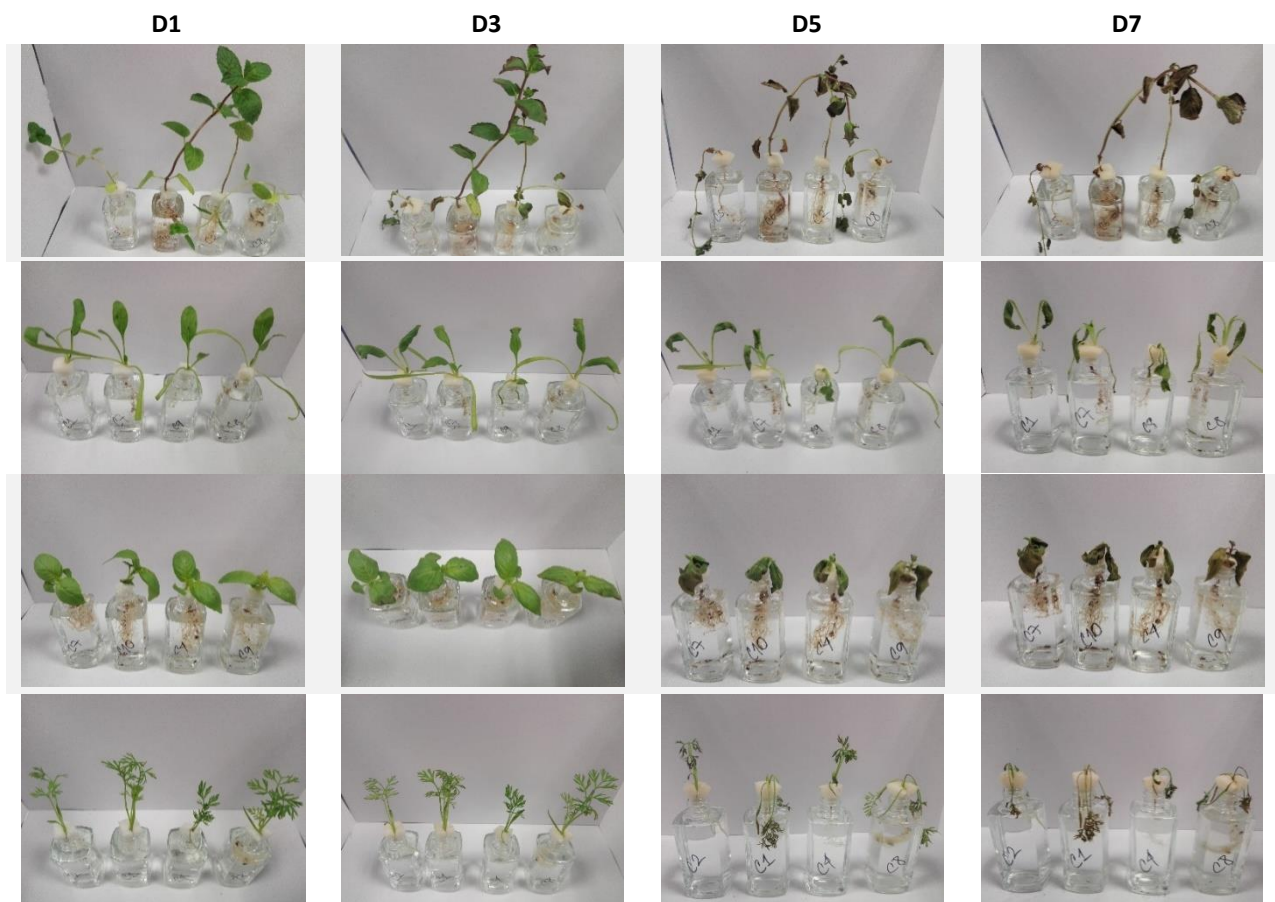


Figura 11. Fotografías de plantas expuestas a Cd (100µg/l) tomadas durante los días 1,3,5 y 7.

Las plantas de control también mostraron síntomas de marchitez y manchas necróticas, aunque no estuvieron expuestas a concentraciones de metales pesados como se muestra en la **Figura 12**.



Figura 12. Cambios morfológicos presentados en plantas control (Hierbabuena, espinaca, albahaca y zanahoria).

Es importante resaltar que algunos factores críticos como la temperatura promedio del cultivo de 13°C, pH y anoxia, pudieron afectar la disponibilidad de nutrientes en las plantas, aumentando la producción de ROS y produciendo senescencia en especies vegetales. La anoxia se produce cuando no hay una oxigenación adecuada en el sistema. El pH es un parámetro que influye en el comportamiento químico y la

biodisponibilidad de los otros elementos en el suelo, también está asociado con la bioacumulación de metales en las plantas.⁹⁴ Las mediciones realizadas mostraron bajos valores de pH ácido para las plantas de albahaca, espinaca y zanahoria mientras que la menta presentó un pH neutro. Las mediciones de pH que se muestran en la tabla 6 fueron tomadas el último día de exposición.

Tabla 6. Concentraciones de Cd en plantas seleccionadas con sus respectivas mediciones de pH

	Cd (mg/l)	pH
Albahaca	0,1008 ± 0.0039	4.8
Hierbabuena	0,0737± 0.0006	7.1
Espinaca	0,0566 ± 0.0566	3.3
Zanahoria	0,0466 ± 0.0466	5.5

Estos factores pueden correlacionar los cambios presentados en las plantas expuestas a Cd y en las plantas control. Para las plantas expuestas a Cd los cambios también podrían estar asociados con la deficiencia de nutrientes en la planta porque algunos tipos de proteínas transportadoras permiten la entrada y la translocación de iones metálicos en la planta, confundiendo el metal con un elemento esencial. Algunos informes indican que esto ocurre debido al valor cercano del radio iónico de algunos elementos como ocurre entre Ca y Cd, y el mismo grupo químico entre elementos que ocurre entre Zn y Cd.^{51,90}

4.4.6 Bioacumulación y translocación de Cd en partes vegetativas de plantas de albahaca

El factor de translocación (*TF*) utilizado para determinar la capacidad de transportar metales desde las raíces hasta las partes aéreas de la planta, se define como el cociente entre la concentración del metal en las partes aéreas y raíz.^{95,96} Se determina usando la siguiente ecuación:

$$TF = \frac{[cc]_{hoja}}{[cc]_{raiz}} \quad (2)$$

Donde $[cc]_{hoja}$ corresponde a la concentración del metal pesado el órgano aéreo, en este caso la hoja y $[cc]_{raiz}$ corresponde a la concentración del metal de interés en la raíz.

Factores de translocación mayores a 1 indican que la planta presenta una gran capacidad para movilizar metales desde la raíz a las hojas. Esto indica que existen condiciones fisiológicas y metabólicas favorables para el transporte del metal de interés a través de los tallos. En este estudio, los factores de translocación resultan mucho menores a 1 cuando la $[cc] > 40 \mu\text{g/l}$.

Para evaluar la bioacumulación en partes diferenciadas de la planta y la correspondiente translocación, se realizaron tareas de caracterización de concentración del metal de interés en los diferentes tejidos (raíz, tallo y hoja) respectivamente.

Los resultados de concentración de Cd en las diferentes partes vegetativas: raíz-tallo-hoja para cada tratamiento: 10 $\mu\text{g/l}$, 50 $\mu\text{g/l}$, 100 $\mu\text{g/l}$ de plantas cultivadas en agua y el factor de translocación (*TF*) se muestran en la **Tabla 7** y se ilustra en la **Figura 13**.

Tabla 7. Resultados de concentración de Cd en raíz, tallo y hoja de plantas de albahaca y resultado del factor de translocación (FT)

Tratamiento (µg/l)	Raíz (mg/l)	ε (%)	Tallo (mg/l)	Hoja (mg/l)	ε (%)	FT	ε%(FT)
10	0,10 ± 0.06	60	0,06 ± 0.03	0,10 ± 0.05	50	0,98 ± 0.08	53
50	0,31 ± 0.06	19	0,08 ± 0.02	0,09 ± 0.04	44	0,29 ± 0.11	9
100	0,50 ± 0.04	8	0,10 ± 0.02	0,07 ± 0.03	43	0,14 ± 0.18	4

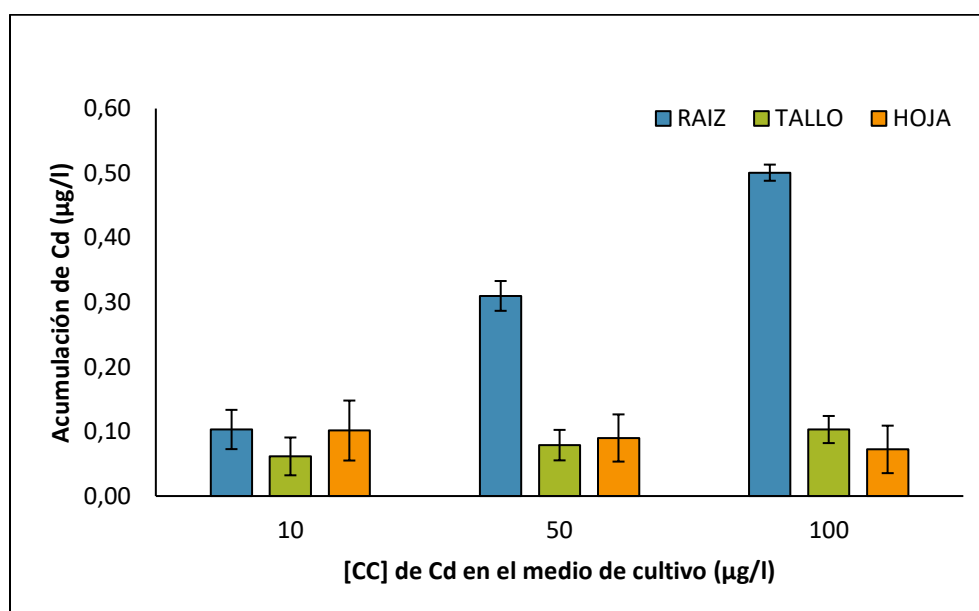


Figura 13. Acumulación de Cd en raíces, tallos y hojas de plantas de albahaca expuestas a diferentes concentraciones. 10µg/l, 50µg/l, 100µg/l.

La mayor acumulación según estos resultados de Cd se registra en la raíz, mientras que en hoja y tallos la acumulación se hace mucho menor. En la **Figura 14** se muestran las extrapolaciones para la acumulación de Cd en raíz, tallo y hoja. Se hace evidente el crecimiento polinómico de la concentración de Cd en la raíz, que permite afirmar que en la raíz se presenta el comportamiento potencialmente hiperacumulador. Este comportamiento puede deberse a que el aumento en la concentración de Cd incrementa la producción de quelatos como la metalotioneinas y las fitoquelatinas lo que inhibe la translocación de este elemento tóxico a las partes aéreas.^{95,97}

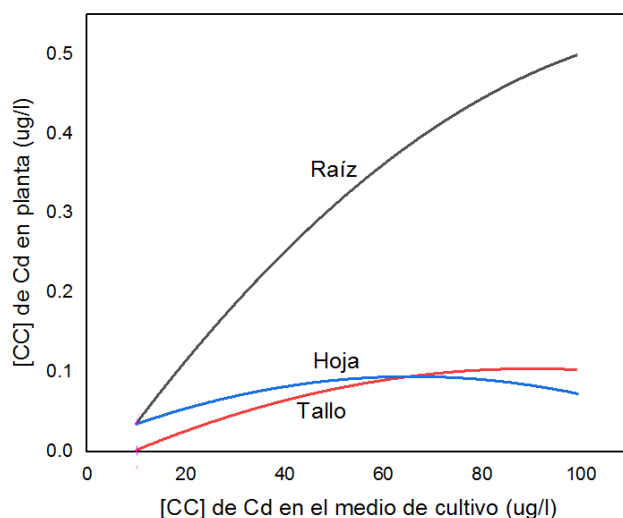


Figura 14. Líneas de tendencia para la concentración de Cd en raíz, tallo y hojas en función de la concentración de Cd en el medio de cultivo

Se observa que el factor de translocación se reduce drásticamente cuando la concentración del Cd se hace mayor, tal como se registra en la ecuación de la curva de tendencia obtenida de los resultados de la **Figura 15**.

$$FT = 0.0002[cc]^2 - 0.003[cc] + 1.2 \quad (3)$$

en donde $[cc]$ corresponde a la concentración de Cd en $\mu\text{g/l}$ al que se expone la planta en el cultivo en agua, y FT corresponde al Factor de Translocación.

Para valores de concentración de Cd de $10 \mu\text{g/l}$, la acumulación en raíz y hojas se hace similar. Esto se debe a que para este reducido valor de concentración se hace más sensible la incertidumbre en la medición tal como lo indican los errores relativos de la translocación que se muestra en la **Figura 13**. Así, si se asume la tendencia polinómica de la translocación que muestra la curva de la **Figura 14** con su respectiva ecuación (3), para una concentración de $1 \mu\text{g/l}$ se obtendría un valor de translocación aproximado de 1.2, mientras que para $100 \mu\text{g/l}$ el FT es cercano a 0.2 Para concentraciones de $10 \mu\text{g/l}$ correspondientes a la mínima permisible, el factor de translocación es igual a 0.98.

De los resultados obtenidos, se hace posible identificar a la raíz como la parte de la planta de albahaca en la que se hace posible diseñar métodos de sensado para detección de Cd *in Situ*. Identificar el factor de bioacumulación y el factor de translocación son dos de los aspectos fundamentales que se requieren para diseñar una estrategia de sensado *in Situ* en plantas afectadas por contaminación por metales pesados. Esto implica que plantas con diferentes FT y BCF requieren diferentes protocolos para sensado. Esto compromete seriamente la opción de desarrollo de un sensor para detección de metales pesados en plantas con características de Universalidad. Es necesarios evaluar la especificidad en términos de FT y BCF .

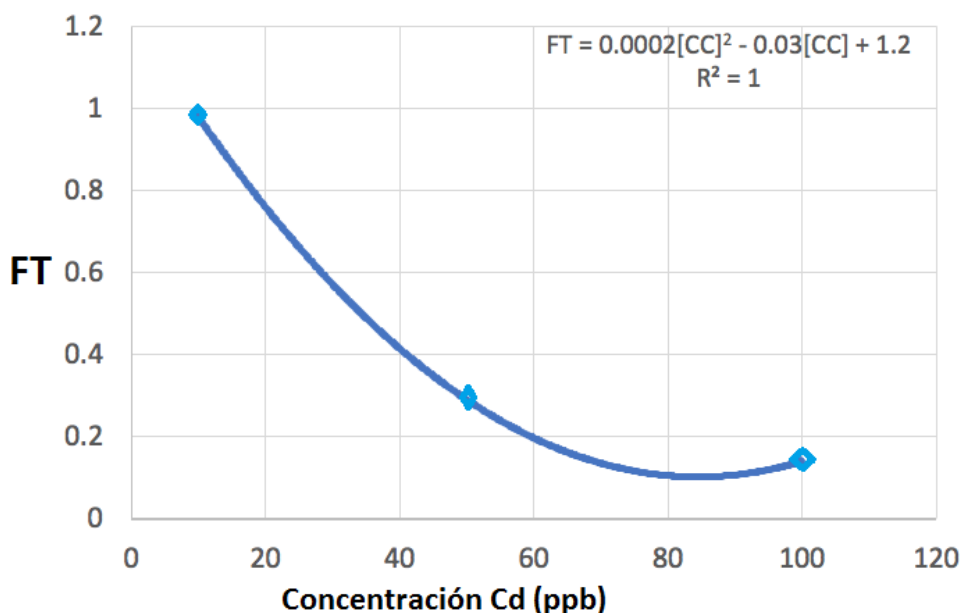


Figura 15. Factor de translocación (FT) de plantas de albahaca expuestas a concentraciones de Cd de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.

4.4.7 Un modelo para transporte y bioacumulación del Cd en raíces, tallos y hojas de plantas de albahaca

Se puede afirmar que los cambios morfológicos varían de acuerdo con el tipo de especie. Algunas especies son consideradas hiperacumuladoras cuando el BFA es mayor a 10, acumuladoras cuando el factor se encuentra por encima de 1 y no acumuladoras cuando el factor se encuentra por debajo de 1.^{44-45,59} Estas diferencias de valor están determinadas por diferentes factores, tales como: características propias de la planta (edad, especie, follaje, etc), especiación del metal, características del medio y procesos moleculares (transportadores y procesos de bioacumulación).^{5,38,59,98} Estudios recientes muestran que la hiperacumulación de metales pesados está relacionada con la capacidad que los metales le confieren a las plantas para inhibir infecciones de tipo microbiano y acciones de depredación.⁹⁹

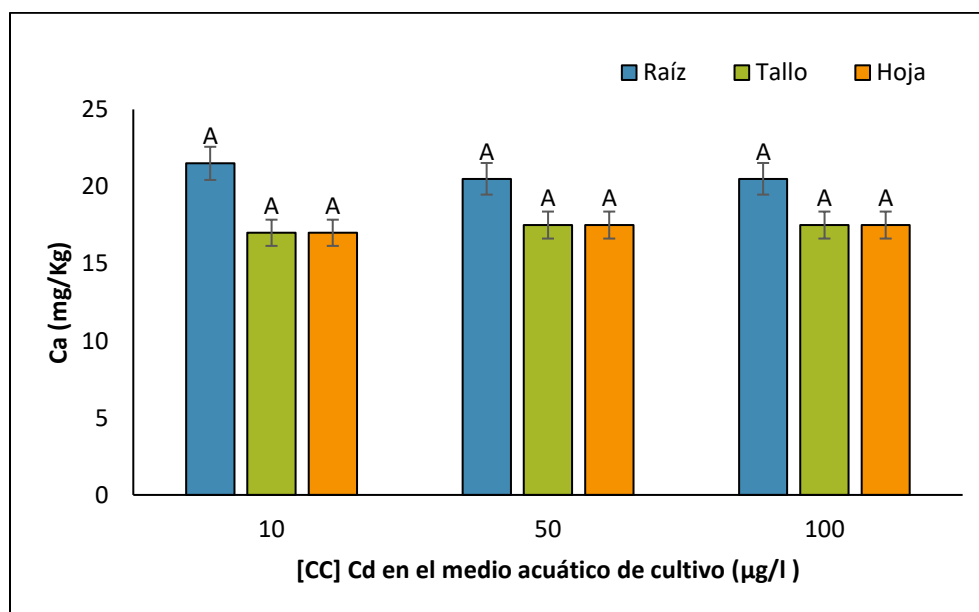
Es bien sabido que la deficiencia de nutrientes en las plantas genera cambios morfológicos. Por ejemplo, el Ca ingresa a la planta en su forma divalente Ca^{2+} y se encuentra involucrado en la estabilidad de la pared celular, la estructura de la membrana, la permeabilidad, la señalización y el funcionamiento de algunas hormonas en las señales ambientales. Su deficiencia se manifiesta en el desarrollo deficiente de la raíz, cambios morfológicos en tejidos más jóvenes y áreas meristemáticas.¹⁰⁰⁻¹⁰² Además, esta deficiencia se manifiesta como debilidad del tallo, clorosis en las hojas adultas y, posteriormente, necrosis, pérdida de turbidez y marchitez¹⁰³, tal como se observó en los casos anteriormente registrados en la **Figura 11** y **Figura 12** respectivamente.

Para identificar la influencia del Cd a diferentes concentraciones, se realiza una prueba de ANOVA no paramétrica Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 0,05 y un análisis de las comparaciones de Dunn. Se elige una prueba no paramétrica porque los datos no cumplen el requisito de normalidad. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Media de concentración de nutrientes en tejidos vegetales de plantas de albahaca expuestas a concentraciones de Cd: 10µg/l, 50 µg/l y 100 µg/l.

Tejido	[CC] Cd (µg/l)	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Zn
Raíz	10	21.5	17.58	21.17	30.5	20.58	21.042
		20.5	19.3	19.83	30.5	30.5	24.5
		20.5	17.33	23.83	30.5	26.17	19.08
Tallo	50	17	18.08	17.79	9.2	7.52	9.875
		17.5	17.1	18.5	17.8	17.2	6.5
		17.5	18.33	15.67	8	6.5	24.5
Hoja	100	17	19.83	16.54	15.8	27.5	24.583
		17.5	19.2	17.17	7.3	7.8	24.5
		17.5	19.83	16	17	22.83	11.92

Las medias de concentración de Ca, Mg y K no se ven afectadas por la exposición al Cd en las diferentes partes vegetativas de la planta: raíces, tallos y hojas tal como se ilustra en la **Figura 16**.



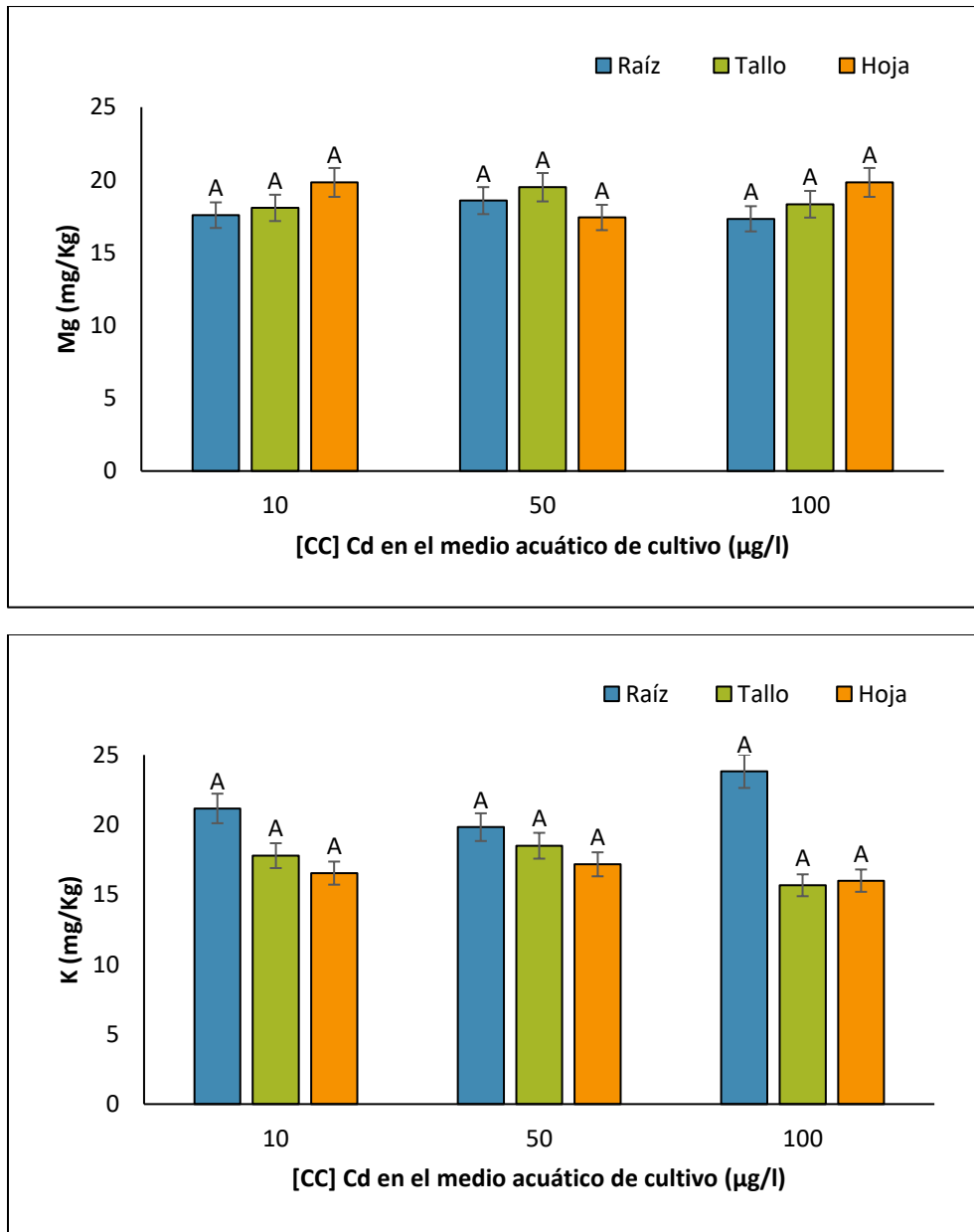
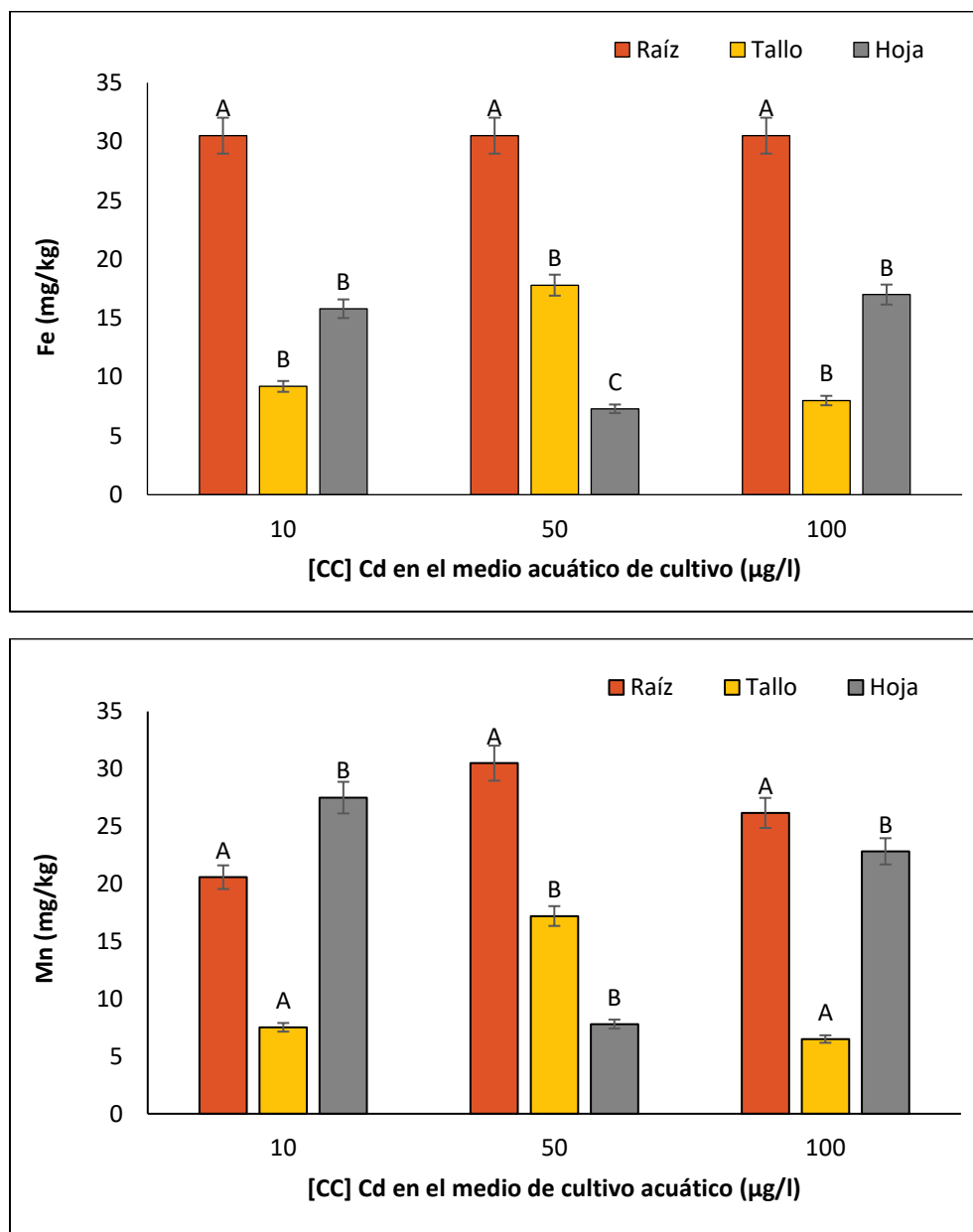


Figura 16. Análisis de comparaciones Dunn's all-pairwise para Ca, Mg Y K en raíz, tallo y hoja por concentraciones de Cd de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.

Otros elementos como Fe, Zn y Mn se conocen como micronutrientes porque su concentración es menor en comparación con los macronutrientes. El Fe es absorbido por plantas como Fe^{3+} , Fe^{2+} o ion ferroso. A diferencia de otros micronutrientes, se requiere en mayor cantidad porque es parte de los grupos catalíticos de muchas enzimas como los citocromos, peroxidasa, catalasa, entre otros. También está vinculado a grupos tioles de cisteína en otras proteínas de hierro y azufre. La deficiencia de este elemento expresa síntomas de clorosis en las hojas jóvenes y, en casos críticos, las hojas se vuelven blancas.^{104,105} El Mn es absorbido por la planta como un catión divalente Mn^{2+} y es de gran importancia en el proceso de fotosíntesis ya que está relacionado con la producción de oxígeno. También participa en la producción de clorofila y en la activación de enzimas catalíticas. Su deficiencia se expresa como una clorosis intervenal, manchas necróticas, caída de hojas y reducción de frutos.^{93,106,107} El Zn se absorbe en su forma divalente como Zn^{2+} . Participa como un

activador enzimático en diferentes procesos metabólicos y también se considera un regulador de la expresión génica. Su deficiencia se manifiesta como disminución del crecimiento de las hojas, disminución del área de las hojas, coloración amarillenta de las hojas, clorosis intervenal, apariencia anormal de raíces y tallos.^{105,106}

Para los micronutrientes: Fe, Mn y Zn, se observa que las medias de concentración se ven afectadas en las diferentes partes vegetativas de la planta por el Cd a concentraciones de 10 $\mu\text{g/l}$, 50 $\mu\text{g/l}$, 100 $\mu\text{g/l}$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**.



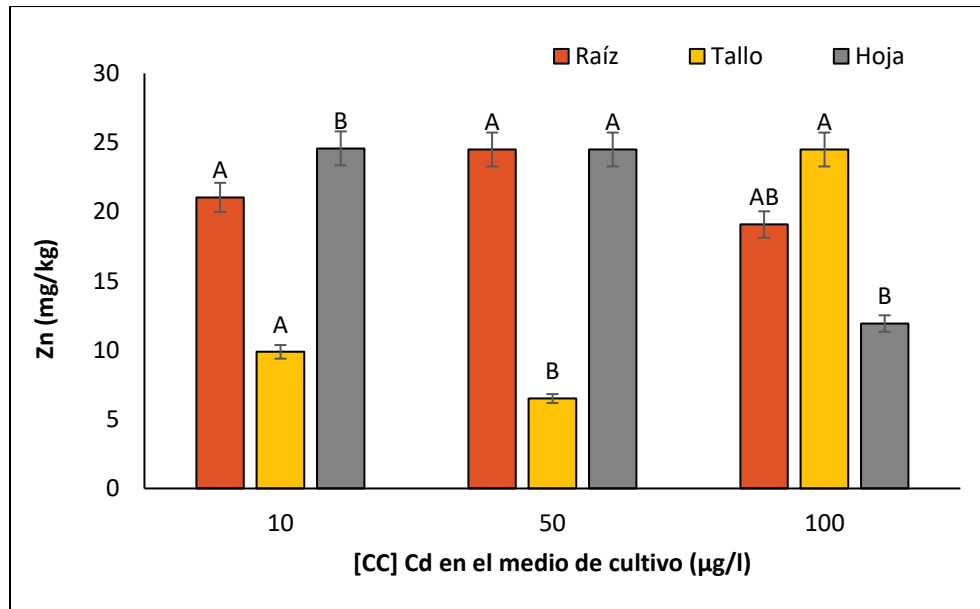


Figura 17. Análisis de comparaciones *Dunn's all-pairwise* para Fe, Mn Y Zn en raíz, tallo y hoja por exposición a Cd a concentraciones de 10µg/l, 50µg/l y 100µg/l.

El análisis de comparaciones para cada elemento identifica grupos diferentes para cada elemento.

Para el **Fe**, se puede observar:

- i) La disponibilidad de este elemento en la raíz no cambia para exposición a Cd a cualquiera de las concentraciones seleccionadas.
- ii) La distribución del elemento en la raíz no guarda relación con la disponibilidad del elemento para tallo y hoja para los tratamientos de 10 µg/l y 100µg/l mientras que para el tratamiento de 50µg/l no hay ninguna relación entre las tres concentraciones de Cd.
- iii) La media de distribución de Fe es más alta en la raíz que en tallo y hoja.

Para el **Mn** se observan dos grupos diferentes de distribución (A y B) para los diferentes tejidos. Para las concentraciones 10 y 100 µg/l se observa el mismo grupo A en raíz y tallo, mientras que en la hoja se observa el grupo B. En el tratamiento de 50 µg/l se observa el grupo A en raíz, pero tallo y hoja conservan el mismo grupo B.

Con respecto al **Zn** se puede observar que la media de distribución en raíz se mantiene en el grupo A para las concentraciones de 10 y 50 µg/l mientras que para la concentración de 100 µg/l se observa el grupo AB el cual puede indicar el cambio de concentración que pasa de la raíz al tallo. Para las concentraciones de 10 y 100 µg/l se observan los mismos grupos en tallo (A) y hoja (B). Para la concentración de 50 µg/l se observa el grupo B en tallo y el grupo A en hoja. Los diferentes grupos indican el cambio de concentración que se presenta de un tejido a otro, esta variación puede estar relacionada con factores moleculares tales como el tipo y número de transportadores presentes en las diferentes capas de cada tejido.

Los cambios morfológicos que presentan las plantas son un indicativo de contaminación por un elemento específico, pero también pueden indicar la deficiencia de nutrientes esenciales. En el estudio de acumulación de Cd en tejidos (raíz, tallo y hoja) de las plantas de albahaca, el análisis de comparaciones *Dunn's* para micronutrientes Fe, Zn y Mn indicó diferentes grupos (A, B, AB) haciendo referencia a la influencia del Cd con

respecto a las diferentes concentraciones de cada elemento en los diferentes tejidos. Con respecto a macronutrientes Ca, Mg, K no se observó ninguna variación significativa teniendo en cuenta que en análisis de comparaciones solo se obtuvo un único grupo (A). Esto permite usar estas variaciones para el diseño de sistemas de sensado.

4.4.8 Estudio de Bioacumulación de Cd²⁺

El Cd es un elemento de transición que se ubica en el grupo 12 de la tabla periódica entre el Zn y el Hg. Se encuentra en bajas concentraciones en el ambiente y su incremento se debe a las diferentes actividades antrópicas tales como manufactura y uso de fertilizantes y plaguicidas, combustión de fósiles, producción de metal y acero, producción de metales no ferrosos, industria de galvanizado, producción de baterías, incineración de basuras, minería de Zn, Pb y Cu entre usos.^{32,37,108}

El Cd es un ácido blando de Lewis que muestra mayor afinidad por los ligandos blandos, ligandos sulfhidrilos (S), iones S²⁻ y grupos SH⁻, con los cuales forma complejos muy estables.^{109,110} Presenta poca afinidad por los grupos carboxilo e imidazol.^{110,111} La **Tabla 9** muestra valores característicos para este elemento químico.

Tabla 9. Propiedades físicas y químicas del Cd

Número atómico	48
Masa atómica (g/mol)	112,40
Valencia	2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,7
Radio covalente (Å)	1,48
Radio iónico (Å)	0,97
Radio atómico (Å)	1,54
Configuración electrónica	1s ² 2s ² 2p ⁶ 3s ² 3p ⁶ 4s ² 3d ¹⁰ 4p ⁶ 5s ² 4d ¹⁰
Primer potencial de ionización (eV)	9,03
Punto de ebullición (°C)	765
Punto de fusión (°C)	320,9

El Cd no es un elemento esencial para los seres vivos y es considerado un elemento altamente tóxico porque interfiere en las rutas metabólicas de otros elementos tales como Zn, Cu, Ca y Fe que tienen funciones específicas en los organismos vivos.^{110,112} En seres humanos, el Cd se compleja con las metalotioneinas y se acumula en riñones e hígado. Cuando las metalotioneinas no pueden ser sintetizadas por estos órganos, el Cd genera efectos tóxicos sobre el organismo tales como daños en riñones, daños en sistema óseo y cáncer de próstata, riñón, vejiga y seno.³⁶

En la literatura se ha reportado la relación del Cd y el Zn debido a que se encuentran en el grupo 2B de la tabla periódica y tienen la propiedad de formar complejos con ligandos que contienen oxígeno, nitrógeno y sulfuro en sus grupos funcionales.¹¹⁰ La química de coordinación y la falta de potencial Redox del Cd²⁺ y el Zn²⁺ es similar debido a la similitud en el número de electrones que se encuentra en la capa electrónica d pero el radio iónico del Cd²⁺ (0,97Å) es más grande que el del Zn²⁺ (0,74Å) y esta diferencia le permite al Cd²⁺ tener mayores números de coordinación. Para el caso específico del Ca, la cercanía de los radios iónicos del Cd²⁺ y el Ca²⁺ le permite al Cd²⁺ unirse a los sitios de unión del Ca²⁺.¹¹²

4.4.8.1 Cd en el ambiente

El Cd ingresa a la atmosfera a través de incendios forestales, volcanes y actividades industriales.¹⁰⁸ La especiación del Cd en la atmosfera se encuentra como óxido (CdO), cloruro (CdCl), sulfato (CdS) o como polvo fino de CdO.^{113,114} El Cd que se encuentra en la atmosfera es retenido por largos periodos de tiempo y otra parte es depositada en suelos y aguas con una especiación depende de las propiedades fisicoquímicas del medio. En agua la especiación del Cd en el agua depende del pH, la Salinidad y la dureza del agua, mientras que para el suelo se tienen en cuenta el contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, concentración de otros elementos que se encuentra presentes, tipos de suelo y pH entre otras.^{36,113}

La especiación de Cd en aguas varía para el tipo de agua, en aguas dulces con valores de pH entre 6 y 8 predomina el Cd²⁺ mientras que en el agua marina predominan los clorocompuestos CdCl⁺ y CdCl₂ por la fuerte complejación del Cd con los iones de cloruro. En suelos, los mecanismos de adsorción dependen del Intercambio de iones, adsorciones específicas, presencia de ligandos tales como tiosulfato, ácidos húmicos, glicina, tartrato y fosfato, y la competencia con otros iones metálicos como el Ca²⁺ y el Mg²⁺ que reducen la adsorción del Cd.¹¹³

En suelos ácidos la materia orgánica y los sequioxidos controlan la solubilidad del Cd, mientras que en suelos alcalinos el Cd no es móvil y se precipita como carbonatos y fosfatos insolubles, además favorece la formación de especies Hidroximonovalentes CdOH⁺.¹¹⁴ Los parámetros de pH y la acidificación de la rizosfera son parámetros que influyen en la bioacumulación de Cd u otros metales pesados en plantas dando ingreso a la cadena trófica.³²

El ciclo del Cd y el ingreso a diferentes matrices ambientales se muestra en la **Figura 18**.

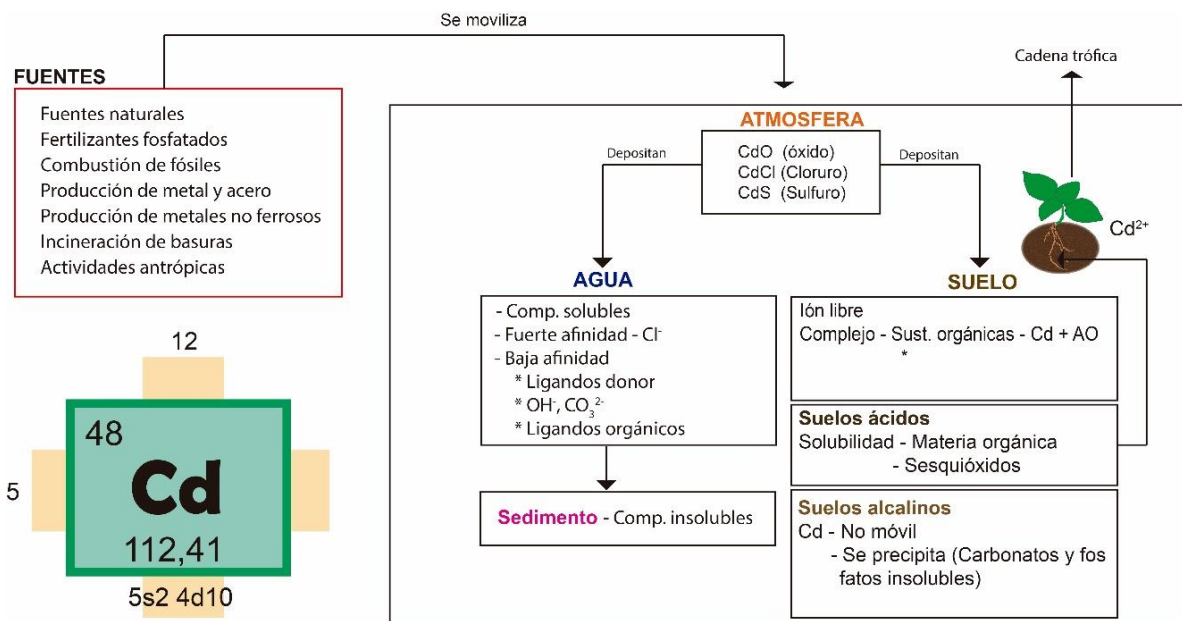


Figura 18. Movilidad del Cd en el medio ambiente. Imagen elaborada por el autor.

4.4.8.2 Un modelo de bioacumulación de Cd²⁺ en plantas

El catión Cd²⁺ se bioacumula en plantas. El proceso de bioacumulación se describe en cuatro fases: movilización, secuestro/ translocación, transporte por el xilema, floema y compartimentalización y distribución del Cd²⁺ en tejidos aéreos de la planta según lo reportado en la literatura.^{4,32,38,63,98}

El proceso de bioacumulación consta de 4 etapas importantes: Movilización, secuestro y translocación, transporte por el xilema y floema, compartimentalización y distribución de iones de Cd²⁺ a tejidos.^{34,37,38,48,52,63}

El proceso de bioacumulación propuesto en este trabajo se ilustra en la **Figura 19** y se describe a continuación:

1. **Movilización.** El ingreso de iones desde la raíz a las partes aéreas de la planta depende de varios factores, tales como: i) **Características del suelo**, tamaño de partícula, pH, capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica, entre otros; ii) **Características de la planta**, dentro de las cuales se destacan tamaño, especie, edad, proceso de transporte molecular. iii) **Especiación química de metales pesados**, y iv) **Actividad microbiana**.^{4,37}
2. Se debe tener en cuenta, además, aspectos como la acidificación de la rizosfera y la exudación de carboxilatos esto debido a que las secreciones de ácidos orgánicos tienen por objeto proteger las raíces de las plantas con respecto a la toxicidad de metales. Algunos ácidos conocidos como el oxálico, cítrico, láctico, tartárico y 2-cetoglucónico tienen propiedades quelantes sobre los metales pesados. Sin embargo, la relación entre ácido metal sigue siendo desconocida, debido a la falta de datos experimentales que den cuenta de las reacciones de ácidos orgánicos en el suelo.^{48,98,115}
3. El ingreso de metales pesados se realiza por medio de proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana plasmática de la epidermis de la raíz tal como se ilustra en la **Figura 19**. Cada familia de proteínas transportadoras permite el ingreso de ciertos cationes por su afinidad con algunos elementos y son altamente selectivas con otros (Ver **Tabla 10**).

Tabla 10. Familias transportadoras que intervienen en el transporte de Cd u otros elementos al interior de la planta. Tomado de Clemens y Ma34, Adamczyk-Szabela et al.⁵¹

Familia	Proteínas	Elementos
ZIP	ZRT, IRT, ZIP 1-4	Fe ⁺² , Zn ⁺² y Cd ⁺²
IRT	IRT1	Fe ⁺² , Mg ⁺² , Zn ⁺² , Co ⁺² y Cd ⁺²
Nramp	ArNramp1, ArNramp3, ArNramp4	Fe ⁺² y Cd ⁺²
LCT	LCT1	Ca ⁺² y Cd ⁺²

Las familias de proteínas: **ZIP** (ZIP1-4, ZNT1-2), **IRT1** (OsIRT1-2), **Nramp** (AtNramp1,3,4,TCNramp3, OsNramp1-2) y **LCT1**, se encuentran localizadas en la membrana celular de la epidermis radicular que dan paso al espacio intracelular (Figura 14) y han sido reportadas para diferentes especies de plantas tales como la *arabidopsis*, *N. Caerulescens*, *Medicago truncatula*, plantas de arroz entre otras.^{98,116} Es importante resaltar que todavía no se han identificado la cantidad de proteínas que permiten el ingreso de los diferentes iones a través de la membrana aunque se ha reportado que la expresión de proteínas puede llegar a variar en cada especie.^{59,98,117}

4. **Secuestro y translocación.** Después de que el Cd^{2+} ingresa al citosol (espacio intracelular de la planta), se activan ligandos de glutatión (*GS2*), fitoquelatinas (*PCs*), metalotioneinas (*MT*) y otro tipo de complejos que aún son desconocidos. Estos complejos se unen al ion metálico (*GS2-Cd(II)*, *PC-Cd(II)*, *MT-Cd(II)*) cambiando su estructura molecular.^{118-120 62} Las *MT* son moléculas que contienen residuos de cisteína (*Cys*) ricos en grupos thiol (-SH). Estos grupos permiten la movilidad del *Cu* y el *Zn* a sitios específicos y se consideran responsables de la quelación del Cd^{2+} y otros metales mediante la formación de complejos (*MT-metal*), aunque esta es una función que no se ha comprobado hasta ahora.^{37,112,121} Las *PCs* son Péptidos con una estructura $(\gamma - Glu - Cys)_n - Gly$ donde $n=2-11$ debido a la presencia de grupos tioles de cisteína.¹²² Las *MT* y *PS* tienen semejanza estructural pero se las *MT* se codifican por genes mientras que las *PS* se sintetizan enzimáticamente.¹²²

La presencia de metales pesados como es el caso del Cd^{2+} induce la síntesis de fitoquelatinas (*PCs*) y metalotioneinas (*MT*) como un mecanismo de protección de la planta.^{59,123} Los ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares también pueden actuar como quelantes y minimizar el daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno (*ROS*).¹⁰⁸

5. Después de que se forman los complejos, éstos son compartimentalizados al interior de la vacuola u otros organelos tales como aparato de Golgi, plásmidos, mitocondrias y cloroplastos. Las *PCs* ricas en grupos SH intervienen en el confinamiento vacuolar de los metales pesados mediante transportadores de tipo ABC.¹²⁴ En este grupo se encuentran las proteínas *HMA* (*OsHMA2-3*, *AtHMA3*), *ABC* (*OsABCC1*), *AtMRP1-2*^{46,98,125} aunque también se han identificado transportadores de intercambio catiónico *CDT* (*MTPs*) que al igual que la familia ABC actúan como proteínas antiporte de Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} .^{98,117} Con respecto a la membrana de los otros organelos se han identificado transportadores *MTPs*, pero aún se desconocen en su totalidad.^{46,116,123} Cuando la planta detecta sobredosis de *Cd* u otro elemento expresa proteínas de la familia *Nramp* (*Nramp3-4*) que permite la salida del complejo para detoxificar la vacuola.^{59,116}
6. **Transporte Xilema y Floema.** Cuando los complejos son descompartimentalizados se trasladan vía simplasto y apoplasto hacia las otras capas de la raíz (córtex-endodermis-periciclo-parénquima estelar). En cada capa, los iones pueden ser compartimentalizados de la misma manera que en la epidermis radical. Sin embargo, en el córtex y el periciclo se encuentra la banda de Caspary, la cual impide el transporte vía apoplasto como mecanismo de defensa de la planta de exceso de elementos tóxicos. Según Clemens⁹⁸ se identificaron transportadores *HMA* (*OsHMA2*) localizados en el córtex y periciclo que permiten el transporte vía apoplasto-simplasto, por los diferentes tipos de células radicales en plantas de arroz.
7. Los complejos que logran llegar hasta el parénquima estelar se exportan al tallo vía xilema o floema a través del apoplasto y/o simplasto formando complejos de *PCs* por medio transportadores *ZIP* y *HMA*.⁶³ Según Clemens³⁴ la vía floema puede ser la principal ruta de bioacumulación de metales pesados en partes aéreas de la planta, además puede movilizar los iones metálicos desde hojas a raíces nuevamente. Los transportadores *HMA* (*OsHMA2,3*) y *LCT1* (*OsLCT1*) son los responsables de la translocación de los complejos vía floema.^{125,126}

Una vez la vacuola compartimentaliza una gran cantidad de iones, se abre paso a la expresión del transportador *OsHMA2* en el tonoplasto de las células parenquimáticas del xilema con el objeto de compartimentalizar iones tóxicos.^{98,127}

Los iones que no son compartimentalizados o que son descompartimentalizados por exceso en la vacuola, salen del xilema y floema por medio de transportadores *ZIP* y *ZMA* para el caso del xilema y *HMA* para el floema. Los complejos de iones que salen atraviesan las células vessel, células del haz, células del mesófilo y finalmente a las células de la epidermis, por medio de transportadores *HMA* Y *ZIP*.¹²⁵

8. **Compartmentalización y distribución de Cd^{2+} a tejidos.** Los complejos que logran llegar a las células del mesófilo y la epidermis son compartimentalizados en los cloroplastos, en la vacuola y en las mitocondrias. Los transportadores que se ubican en la membrana de estos organelos pertenecen a las familias HMA y MTS. Aunque, se resalta la falta de información con respecto al total de familias transportadoras que intervienen todo el proceso.⁹⁸

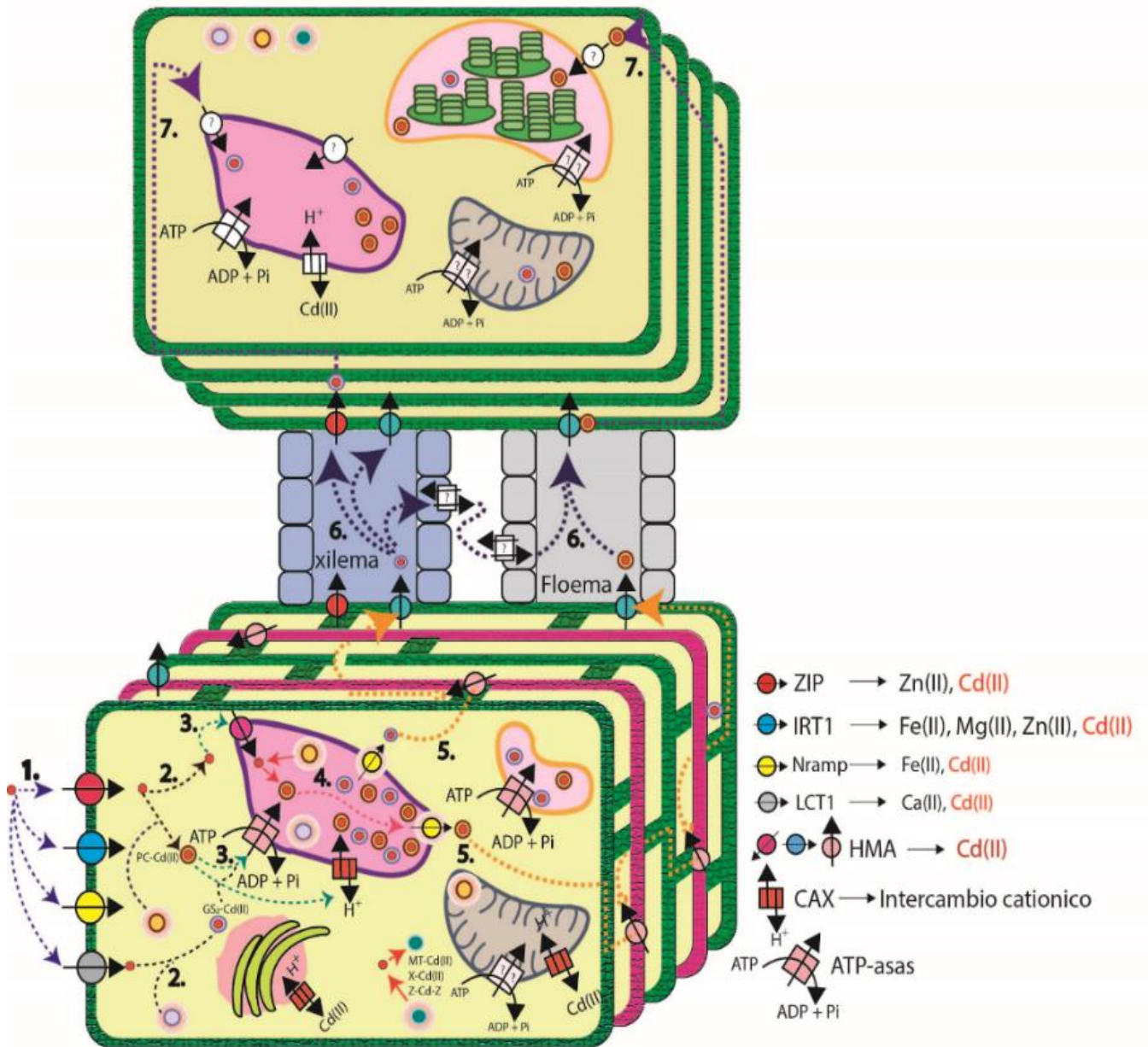


Figura 19. Proceso de bioacumulación de Cd en plantas. Imagen elaborada por el autor.

5 CONFIGURACIÓN RADIOMÉTRICA FLUORESCENTE TIPO OFF-ON PARA DETECCIÓN DE Cd

5.1 INTRODUCCIÓN

La detección de metales pesados tales como Hg, Cd, Pb y As en matrices ambientales aire, agua y plantas se realiza por medio de métodos espectrométricos, electroanalíticos y cromatográficos, los cuales presentan algunas limitaciones en cuanto a costo, portabilidad, tiempos de medición, pretratamiento de muestras, etc.¹⁴⁻¹⁶

Los biosensores a diferencia de los métodos analíticos convencionales, presentan características de portabilidad, sensibilidad, adecuados límites de detección, reproducibilidad selectividad, versatilidad en diseño y arquitectura del biosensor, además, dentro de las estrategias de monitoreo no se requieren protocolos de toma, transporte y posterior procesamiento de muestras en condiciones controladas.¹²⁸⁻¹³¹

Los biosensores son herramientas analíticas que se componen de un bioreceptor integrado a un transductor que detecta la señal fisicoquímica que ocurre durante la interacción entre el bioreceptor y el analito y la convierte en una señal de medida de fácil detección o cuantificación, la cual es medida por un detector o procesador electrónico que se encarga de amplificar, procesar y exponer la señal recibida.¹³² Los biosensores se clasifican de acuerdo con el tipo de bio-reconocimiento y el tipo de transducción.^{132,133} El tipo de bio-reconocimiento hace referencia al biocomponente que se inmoviliza para su respectiva detección, el cual puede ser una célula, una proteína, una enzima, una cadena de código genético, un anticuerpo u otro elemento biológico^{130,133} mientras que, el tipo de transducción hace referencia a la señal de transducción que puede ser física o fisicoquímica.¹³⁴

Diferentes tipos de biosensores tales como sensores moleculares electroquímicos, colorimétricos y fluorescentes han sido empleados para la detección de metales pesados en agua y suelo.¹³⁵⁻¹³⁸ Mientras que en plantas, el uso de biosensores se ha enfocado principalmente en la detección de residuos de plaguicidas, patógenos y toxinas en frutas y hortalizas que afectan la inocuidad de estos alimentos y pueden generar efectos negativos en la salud de las personas que los consumen.¹³⁹

Los sensores moleculares también llamados quimiosensores son unidades moleculares que se componen de un elemento de reconocimiento (molécula), un elemento de señalización y un espaciador para emitir una respuesta analítica.¹⁴⁰

Los sensores moleculares fluorescentes son de gran interés para la detección de diferentes contaminantes entre ellos metales pesados porque son altamente sensibles a bajas concentraciones del analito de interés, son de bajo costo y brindan respuesta en tiempo real permitiendo la detección *In situ*, mediante la variación de la intensidad de fluorescencia o la variación de la longitud de onda fluorescente.^{140,141}

Estos sensores emplean diversas clases de fluoróforos tales como: quinolina, diferentes tipos de rodamina, cumarina, fluoresceína entre otras, que pueden ser excitados por la luz visible produciendo una señal de detección de sensores ópticos para la detección de diferentes iones metálicos tales como: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , and Ag^+ que impactan negativamente el ambiente.¹⁴¹⁻¹⁴³

En el diseño de sensores moleculares fluorescentes para detección de metales pesados se han reportado diferentes tipos de configuraciones tales como sensores tipo **PET** (*Photoinduced electron transfer*), **FRET** (*Fluorescence resonance energy transfer*) y **ICT** (*intermolecular charge transfer*) entre otras. Los sensores tipo PET se componen de un fluoróforo, un espaciador que actúa como mediador del proceso PET que debe ser lo

suficientemente corto para permitir la transferencia electrónica lo suficientemente rápido para superar la fluorescencia y un receptor. El mecanismo FRET está conformado por una molécula que se forma a partir de dos fluoróforos conectados a través de un espaciador o dos proteínas que se unen a los fluoróforos por enlaces covalentes, y para el mecanismo ICT se requiere de un fluoróforo y un receptor que usualmente es un grupo amino.^{136,137,144-147}

En este capítulo se presenta la ruta metodológica empleada para encontrar una configuración radiométrica fluorescente para detección de Cd^{2+} . Inicialmente se preseleccionan los fluoróforos quinolina yellow (QY) y Rodamina B (RB) y la molécula Diethylenetriamine (DETA) por la presencia de grupos aminos en su estructura molecular y la afinidad que tienen con el Cd^{2+} . Se caracterizan las propiedades radiométricas de cada fluoróforo mediante mediciones de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia teniendo en cuenta diferentes concentraciones para cada fluoróforo y diferentes solventes: agua y etanol (etOH). De los resultados obtenidos se hace una selección de la concentración y el solvente que proporcionan la mayor emisión de fluorescencia. Después se procede a la caracterización de los fluoróforos con la molécula correspondiente a diferentes radios de volumen. Luego del análisis de resultados entre los fluoróforos y la molécula DETA se selecciona la configuración que brinda mejores resultados para la detección *in situ* del Cd^{2+} .

5.2 MARCO TEÓRICO

5.2.1 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo de medida que incorpora un bioreceptor o elemento de bioreconocimiento, un transductor o elemento de transducción y un detector o elemento de señalización. El **bioreceptor** se compone de los elementos de reconocimiento biológico encargados de detectar el analito. Estos elementos (anticuerpos, enzimas, proteínas, ADN, células u otros) se encuentran inmovilizados sobre un electrodo o plataforma de sensado que permite conservar sus propiedades metabólicas para no alterar la medida o cuantificación del analito. La interacción entre el analito y el receptor puede darse por enlaces químicos fuertes (enlaces no covalentes, enlaces iónicos y enlaces de hidrógeno) o interacciones tipo Van der Waals. El **transductor**, es un elemento que detecta la señal fisicoquímica que ocurre durante la interacción entre el bioreceptor y el analito, y la convierte en una señal de medida de fácil detección o cuantificación. La señal de medida puede ser traducida en una señal electroquímica (variación de corriente, potencial eléctrico, entre otras), óptica (cambio en el índice de refracción, cambio de color, ...) o física (forma, variación de masa, densidad, viscosidad). El **detector** es el dispositivo que se encarga de amplificar, procesar y exponer la señal recibida por el detector.^{130,133,148} En la **Figura 20** se muestra una representación de un biosensor y sus diferentes elementos.

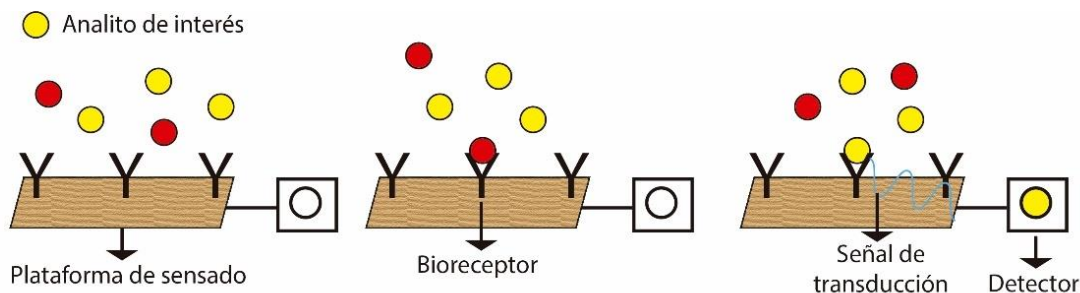


Figura 20. Estructura de un biosensor. Imagen elaborada por el autor

Los biosensores se clasifican de acuerdo con el tipo de bio-reconocimiento y el tipo de transducción.^{132,133} A continuación se describen los dos tipos de clasificación:

Elemento de bioconocimiento. Según el elemento de bioconocimiento, los biosensores se clasifican en biosensores enzimáticos, Inmunosensores, biosensores basados en proteínas receptoras, biosensores basados en fragmentos de ADN y biosensores basados en células completas.^{130,133} Para cada biosensor se han reportado diferentes tipos de transducción, parámetros de medida y ventajas específicas como se mencionan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Clasificación de biosensores por elemento de bioconocimiento. Información tomada de Alhadrami.¹³³

Elemento de Bioconocimiento	Tipo de transducción	Parámetro de medida	Ventajas
Enzimas	Piezoeléctrica	Variación de masa	Análisis rápido Menor interferencia Pequeña cantidad de la muestra
Fragmentos de ADN	Óptica	Fluorescencia	Gran estabilidad Especificidad Bajo costo.
Inmunosensores (anticuerpos)	Electroquímica	Cambios de corriente (Δi), cambios de potencial (Δv), conductividad	Sensibilidad Selectividad Permite combinar anticuerpos
Proteínas receptoras	Óptica	Absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia, reflectancia, Dispersión raman, índice de refracción.	Selectividad Sensibilidad Bajo costo Medición en tiempo real
Células	Óptica	Fluorescencia luminiscencia	Alta especificidad

Tipo de transducción. En esta categoría se tiene en cuenta la transducción, la cual puede ser física o fisicoquímica teniendo en cuenta la naturaleza de la señal. La **Transducción física** identifica el cambio de una variable física (masa, índice de refracción, propiedades dieléctricas, resistividad eléctrica, cambio de temperatura, rapidez de una onda, vibraciones, etc) y la **transducción fisicoquímica** hace referencia al cambio producido en la composición química del analito.¹³⁴

En la **Tabla 12** se menciona el tipo de transducción, los tipos de biosensores, las categorías, el parámetro de medida de cada señal producida por la interacción entre el elemento de bioconocimiento y el analito y las ventajas de cada tipo de transducción.

Tabla 12. Clasificación de biosensores por el tipo de transducción. Información tomada de Vinet y Zhedanov.¹³⁴

Transducción	Biosensores	Categorías	Parámetro de medida	Ventajas
Física	Ópticos	Interferencia	Patrón de interferencia	Selectividad Bajo costo Medición en tiempo real Alta especificidad sensibilidad
		Refracción	Índice de refracción	
		Fluorescencia	Fluorescencia	
		Plasmón superficial (SPR)	Índice de refracción	
	Térmicos	-	Temperatura	
Piezoeléctricos	-	Masa, densidad, viscosidad		

Fisicoquímica	Electroquímicos	Amperométrico	Corriente	Selectividad Alta sensibilidad Bajo costo Mediciones en tiempo real (<i>In situ</i>)
		Potenciométrico	Diferencia de Potencial	
		Conductimétrico	Conductividad	

Los biosensores son de gran interés en la detección de diferentes elementos porque a diferencia de los métodos analíticos convencionales, presentan características de portabilidad, sensibilidad, adecuados límites de detección, reproducibilidad selectividad, versatilidad en diseño y arquitectura. Además, dentro de las estrategias de monitoreo no se requieren protocolos de toma, transporte y posterior procesamiento de muestras en condiciones controladas.¹²⁸⁻¹³¹

Para la detección de metales pesados en matrices ambientales tales como agua y suelo se han empleado sensores moleculares electroquímicos, colorimétricos y fluorescentes.^{142,149,150} Los sensores moleculares se componen de una molécula como elemento de reconocimiento y el elemento de señalización. La interacción entre la molécula y el analito modifica una propiedad específica del elemento de reconocimiento que se manifiesta en una señal de detección.¹⁴⁰

Los sensores moleculares colorimétricos permiten la detección de un analito a través de un cambio de color y se han empleado para detección de metales pesados en agua.^{151,152} Los sensores basados en fluorescencia son altamente sensibles a bajas concentraciones del analito de interés, son de bajo costo y brindan respuesta en tiempo real.^{149,153,154} Los sensores moleculares fluorescentes emplean diversas clases de fluoróforos tales como quinolina, rodamina, cumarina, fluoresceína entre otras, que pueden ser excitados por la luz visible produciendo una señal de detección de sensores ópticos para la detección de diferentes iones metálicos que impactan negativamente el ambiente y también se pueden emplear en medios sólidos, líquidos y gaseosos.¹⁴¹⁻¹⁴³

El uso de sensores moleculares en plantas se ha enfocado principalmente en la detección de residuos de plaguicidas, patógenos y toxinas en frutas y hortalizas que afectan la inocuidad de estos alimentos y pueden generar efectos negativos en la salud de las personas que los consumen.¹³⁹ Para la detección de plaguicidas se han empleado biosensores enzimáticos en muestras de cebolla, lechuga y manzanas, basados en la inhibición de la actividad biocatalítica de una enzima en específico después de la interacción entre la enzima y el pesticida.¹³⁹ También se han empleado biosensores enzimáticos amperométricos para la detección de alcoholes volátiles (metanol y etanol) en zumos de frutas y vegetales tales como tomate, uva, grosella y manzana.¹³⁹ Los biosensores ópticos de fluorescencia se han empleado para detección de toxinas tales como fumonisinas y aflatoxinas en maíz y patógenos tales como *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.^{154,155}

Para mediciones *In situ* se han reportado propuestas para biosensores magnetoelásticos (ME), los cuales permiten la detección de *Salmonella* en superficie de tomates. De otra parte, en Chen et.al 2016 se ha reportado un biosensor configurado para operar con SERS (Surface enhance raman scattering), el cual está diseñado para detección de residuos de pesticidas en plantas. La superficie sensora es una superficie de bio reconocimiento decorada con nanotubos de carbono con un efecto similar al de cinta adhesiva, debido a que al entrar en contacto con la superficie de algunas frutas o vegetales tales como pepinos, naranjas y manzanas retiene residuos de pesticidas.

5.2.2 Sensores moleculares basados en fluorescencia

La luminiscencia se define como una emisión de fotones de especies electrónicamente excitadas o como un fenómeno que experimentan algunos materiales que absorben energía y la emiten nuevamente en forma de luz visible.¹⁵⁶ Se clasifica de acuerdo con el modo de excitación, como se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Tipos de luminiscencia. tomado de Valeur.¹⁵⁶

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (rayos x, α , β , γ)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
termoluminiscencia	Irradiación radioactiva
Quimioluminiscencia	Procesos químicos
Bioluminiscencia	Procesos bioquímicos
Triboluminiscencia	Fuerzas de fricción y electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonido

Los componentes luminiscentes pueden ser componentes orgánicos, inorgánicos y organometálicos. Dentro de los componentes orgánicos se encuentran hidrocarburos aromáticos, fluoresceína, diferentes tipos de rodamina, cumarina, oxazinas, polienos, difenilpolienos y algunos aminoácidos. Entre los inorgánicos se destacan los iones de uranio (UO_2^+), iones de lantánido (Eu^{3+} , Tb^{3+}) y cristales (ZnS , CdS , ZnSe , GaS , GaP , Al_2O_3) entre otros. Y finalmente, entre los organometálicos se encuentran los componentes de rutenio, complejos con iones de lantánido y complejos de agentes quelantes con flúor tales como oxinas.

La fluorescencia es un tipo de fotoluminiscencia y se produce cuando un átomo absorbe y emite radiación electromagnética solo a frecuencias que corresponden a la separación de energía entre los estados permitidos. Cuando la radiación incide sobre el átomo, solo aquellos fotones cuya energía (hf) es igual a la separación de energía (ΔE) entre dos niveles de energía puede ser absorbido. Después de absorber energía, algunos fotones pasan de un estado base de energía más baja a un estado excitado de energía más alta ($M + h\nu \rightarrow M^*$). En el estado fundamental las moléculas tienen sus electrones apareados es decir spines opuestos ($\uparrow\downarrow$).

Después de que el electrón pasa a un estado de mayor energía, el spin del electrón se puede mantener y se denomina estado singlete, pero si el spin se invierte se conoce como estado triplete ($\uparrow\uparrow$). En el estado triplete los electrones tienen tres estados posibles en un campo magnético: i) Los vectores del spin pueden estar alineados con el campo, ii) pueden estar alineados en dirección contraria ó iii) pueden ser perpendiculares al campo.

Cuando la molécula se encuentra en un estado excitado puede perder energía colisionando con otras moléculas o puede emitir energía luminosa de menor longitud de onda. Si la molécula retorna al estado fundamental desde un estado singlete la radiación emitida se le denomina fluorescencia, pero si retorna desde un estado triplete la radiación emitida se denomina fosforescencia. Estos dos procesos hacen parte de la fotoluminiscencia. Aunque también se puede dar el caso de que la energía no se pierda por alguno de estos dos procesos y la molécula interactúe con otros elementos modificando su estructura química y perdiendo energía sin emitir radiación. A este proceso se le denomina quimioluminiscencia.

Por lo general un átomo permanece en estado excitado durante un tiempo de 10^{-8} s, transcurrido este tiempo, el átomo en estado excitado puede volver a su estado basal y en el proceso todos los fotones emitidos durante el proceso son más bajos en energía que el fotón original absorbido por el átomo.^{141,157} El fenómeno de fluorescencia se muestra en la **Figura 21**.

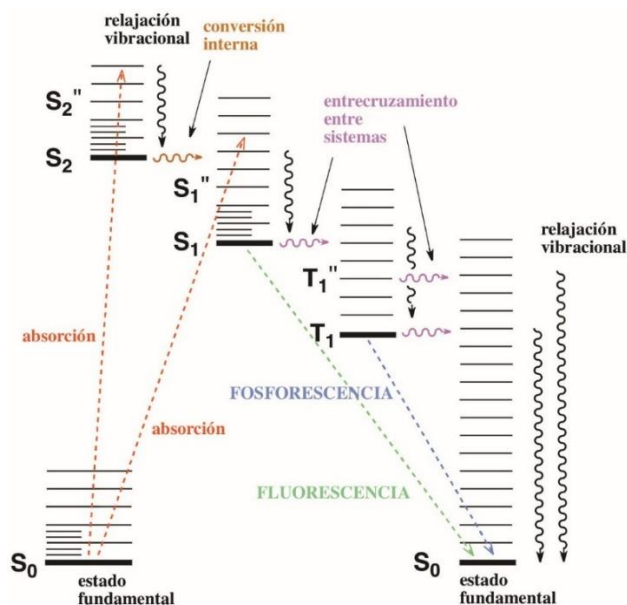


Figura 21. Fenómeno de fluorescencia Tomado de valeur.¹⁵⁶

Los sensores moleculares basados en fluorescencia emplean una molécula como elemento de bioconocimiento. Cuando la molécula recibe la energía necesaria para que los electrones pasen de un estado molecular desocupado (LUMO) a un estado molecular ocupado (HOMO), se da paso a la fluorescencia y el cambio en la distribución electrónica representa una nueva geometría con diferentes reacciones químicas que permiten el desarrollo de sensores moleculares.¹⁴¹ Los sensores moleculares fluorescentes miden la intensidad de cambio de fluorescencia o la variación de la longitud de onda fluorescente y emplean tres mecanismos para la señal de transducción de la fluorescencia los cuales se definen a continuación.^{140,141}

5.2.2.1 Mecanismos de transducción de fluorescencia

PET (Photoinduced electron transfer). Este mecanismo se compone de tres elementos importantes, un fluoróforo, un espaciador y un receptor. El espaciador es un mediador del proceso PET que debe ser lo suficientemente corto para permitir la transferencia electrónica lo suficientemente rápido para superar la fluorescencia. El espaciador se compone de dos a tres átomos de carbono y se encarga del conectar el fluoróforo y el receptor que tiene un par de electrones sin enlaces de alta energía como el átomo de nitrógeno o azufre con capacidad de transferir un electrón al fluoróforo.¹⁴¹ El espaciador se une por enlace covalente al receptor y la transferencia electrónica entre el receptor y el analito permite la detección del analito de interés.¹⁵⁸ Para que se genere el proceso PET el potencial del receptor debe ser menor al potencial del fluoróforo que representa el aceptor ($V_{\text{oxi}}\{R\} < V_{\text{oxi}}\{F\}$).¹⁴⁵

El proceso PET consiste en la unión de un fluoróforo con un receptor por medio de un espaciador. Cuando se emite la energía suficiente para excitar el fluoróforo, un electrón cambia de un estado HOMO a un estado LUMO de mayor energía. Para evitar que se produzca fluorescencia, el receptor transfiere un electrón al estado HOMO del fluoróforo y el estado excitado del fluoróforo se transfiere al estado LUMO del receptor permitiendo un estado OFF en el fluoróforo. Cuando el analito de interés se une al receptor, el receptor no transfiere el electrón al fluoróforo permitiendo la activación de la fluorescencia del fluoróforo y el sensor pasa a un estado ON donde el color de excitación depende del fluoróforo y de la longitud de onda de excitación.¹⁴⁵ El proceso se ilustra en la **Figura 22**.

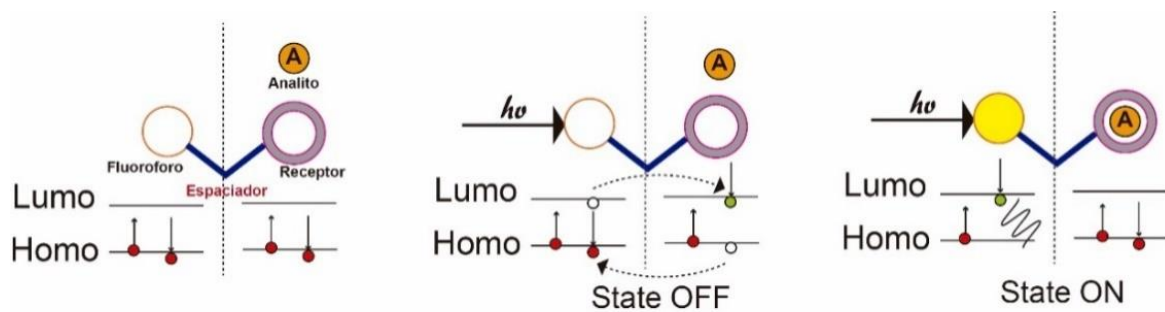


Figura 22. Representación esquemática del funcionamiento de un sensor molecular con mecanismo PET. Imagen elaborada por el autor.

En los sensores moleculares las reacciones químicas orgánicas pueden activar la fluorescencia basada en PET-ON en lugar de la coordinación iónica. En esta configuración un grupo funcional de la molécula sirve como donante para producir “quenching” o desactivación de la fluorescencia, a este proceso se le denomina PET-OFF. En el proceso PET también puede ocurrir un proceso PET ON-OFF mediante el cual el analito al unirse con el receptor se produce un PET-OFF, pero si un segundo elemento se une al analito se activa la fluorescencia, como se observa en la **Figura 23**.^{141,159}

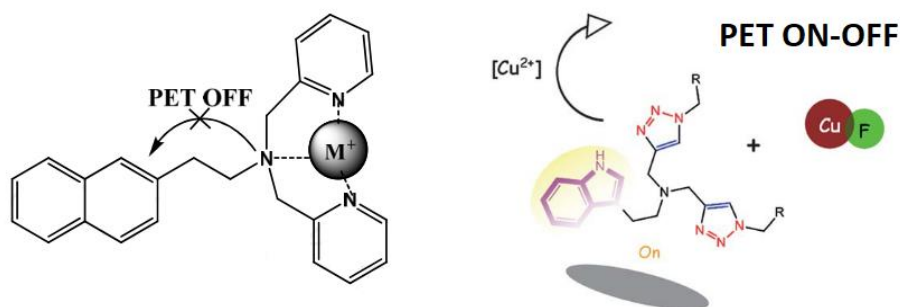


Figura 23. Mecanismo PET-OFF y PET-ON en sensores moleculares. Sistema PET-OFF tomado de Meng et.al 2018 y sistema PET ON-OFF tomado de Shi et.al 2013.

FRET (Fluorescence resonance energy transfer). Este mecanismo se compone de una molécula que se forma a partir de dos fluoróforos conectados a través de un espaciador o dos proteínas por enlaces covalentes. Para que este mecanismo tenga lugar: la distancia intermolecular entre los dos fluoróforos debe ser menor a 10nm y el espectro de absorción del fluoróforo aceptor debe solaparse con el espectro de emisión del fluoróforo donador, esto significa que la energía de emisión del fluoróforo donador debe coincidir con la energía del espectro de excitación del fluoróforo aceptor. Uno de los ejemplos más comunes para explicar este tipo de mecanismo

consiste en una proteína cian fluorescente (CFP) conectada a una proteína x y se emplea una proteína yellow fluorescente (YFP) unida a una proteína y. El espectro de excitación de CFP es de 440nm y el de emisión es de 490nm el cual concuerda con el de excitación de la proteína YFP. Para que el sensor funcione, las proteínas x y y se deben unir para permitir que el fluoroforo donador transfiera energía al fluoroforo aceptor para dar lugar a la fluorescencia.¹⁴¹ El mecanismo se ilustra en la **Figura 24**.

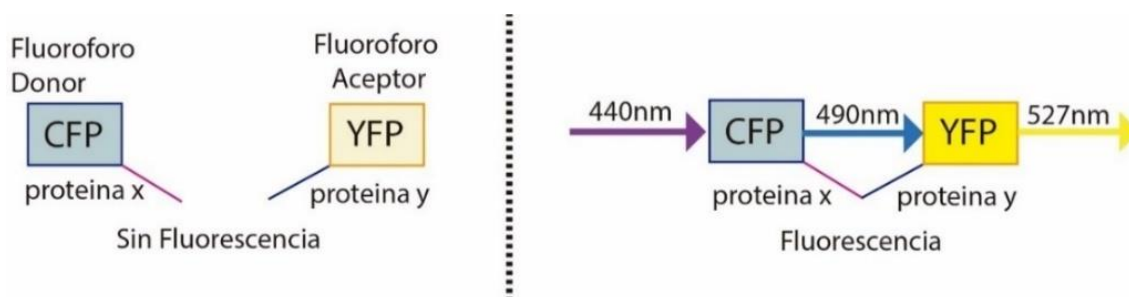


Figura 24. Mecanismo de fluorescencia tipo FRET. Imagen elaborada por el autor

Para detección de iones metálicos, la interacción del ion con las moléculas fluorescentes genera un espectro de emisión diferente al que producen la interacción de las dos moléculas sin el analito de interés. Una representación de este mecanismo se puede ver en la **Figura 25** que muestra un sensor molecular con mecanismo FRET para detección de Cr^{3+} reportado por Adhikari et.al.¹⁶⁰

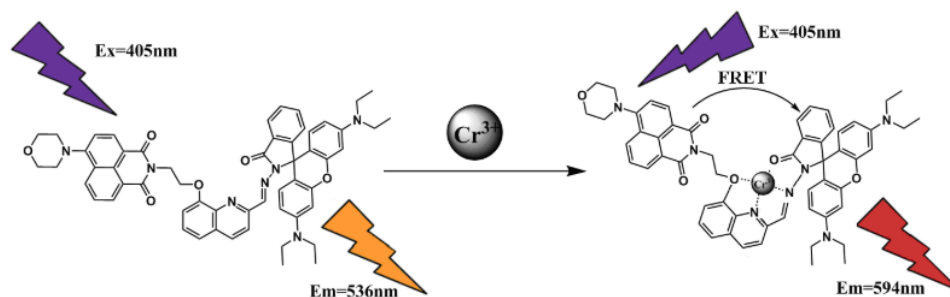


Figura 25. Sensor molecular con mecanismo FRET para detección de Cr^{3+} reportado por Adhikari et.al 2019

ICT (intermolecular charge transfer). Este mecanismo se compone de fluoróforo y receptor el cual es usualmente un grupo amino. Al igual que en un mecanismo PET el receptor dona electrones al fluoróforo dependiente el tipo de ion al cual se enlaza, por ejemplo, si el receptor se une a un catión, el catión reduce la capacidad de electrodonación del receptor y se obtiene un cambio azul en el espectro de emisión. Si el receptor es un receptor de electrones y se coordina con un catión entonces se observará un cambio azul en el espectro de emisión.

Estos mecanismos moleculares han sido la base para el diseño y desarrollo de sensores moleculares basados en fluorescencia que han sido aplicados para la detección de metales pesados en agua. La selectividad del sensor depende de los diferentes elementos que componen el sensor, por ejemplo para detección de metales se han empleado diferentes clases de fluoróforos tales como quinolina, rodamina, cumarina, fluoresceína entre otros y diferentes clases de moléculas que varían de acuerdo al analito y los elementos presentes en el diseño de cada sensor.¹⁴¹⁻¹⁴³

5.2.3 Sensores fluorescentes para detección de Cd

Según lo reportado por Kassal et al¹⁶¹ se han empleado diferentes clases de sensores para detección de metales pesados en aplicaciones ambientales y monitoreo de calidad de agua. De acuerdo con el estudio, los sensores electroquímicos voltamétricos y amperométricos son los más empleados para detección de metales pesados con un 42% de publicaciones, mientras que los sensores ópticos basados en fluorescencia reportan un 7% de publicaciones.

De resultados obtenidos de vigilancia tecnológica, se observa un total de 1209 documentos relacionados a la temática de sensores fluorescentes para detección de Cd, con un incremento notable de producción científica a partir del año 2016 tal como se muestra en la **Figura 26**.

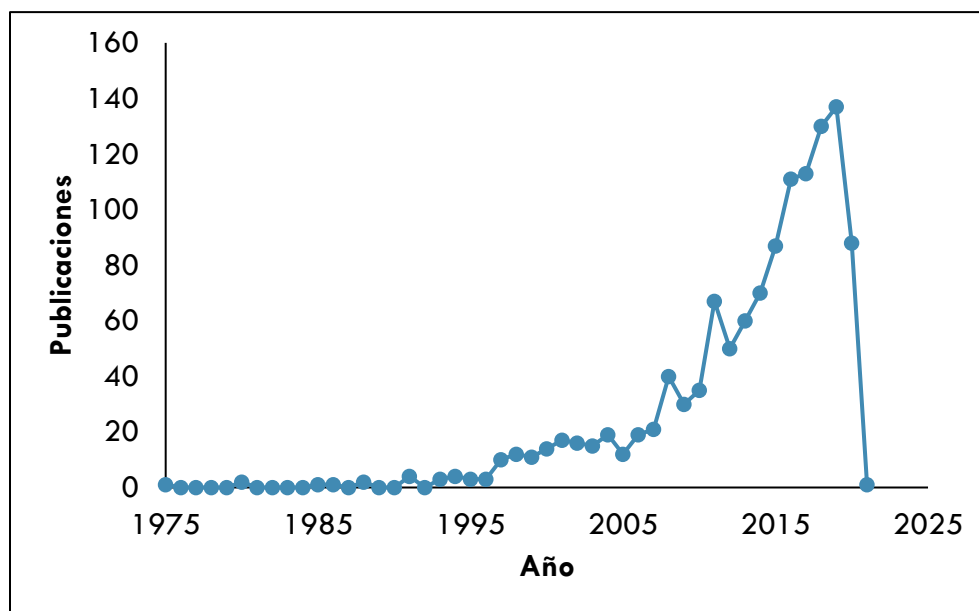


Figura 26. Número de publicaciones asociadas a sensores fluorescentes para detección de Cd obtenida por Scopus.

Los sensores moleculares basados en fluorescencia para detección de Cd han convocado a diferentes áreas del conocimiento tal como se aprecia en los resultados de vigilancia tecnológica: Química (24,5%), bioquímica, genética y biología molecular (17,5%), ciencia de materiales (9,4%), Ingeniería (8,3%), ciencias físicas (8,3%), Ingeniería química (7,3%), Agricultura y ciencias biológicas (6,3%), otras (18,4%). Los países de mayor productividad y oferta investigativa pertenecen al continente asiático debido al fuerte problema de contaminación por metales pesados en alimentos y aguas de consumo humano.

Con respecto a sensores moleculares se destacan del tipo PET, FRET y ICT operativos con de fluoroforos tales como antraceno, derivados de quinolina, y diversidad de moléculas tales como imidiacetatos, naphtalimide, cumarina, pyridinas entre otras.^{137,149,162,163} Los solventes más empleados son soluciones de acetonitrilo (CH₃CN), soluciones acuosas, soluciones buffer (HEPES, Tris-HCL, PBS).^{137,164}

Para la selección del fluoroforo, molécula, espaciador y demás componentes, se debe tener en cuenta la química de coordinación del elemento a sensar. La química de coordinación depende de la geometría y del número de coordinación que forma parte del complejo. El número de coordinación corresponde al número de átomos, moléculas o iones que están en contacto con el átomo central. Para el Cd los principales números

de coordinación son 4,5 y 6, siendo 6 el más común.¹⁰⁹ El número de coordinación varía para cada compuesto o núcleo de coordinación tal como se indica en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Química de coordinación del Cd tomada de Borsari.¹⁰⁹

Número de Coordinación	Componente
2	CdMe ₂ , CdX ₂ (fase gaseosa, X=F, Cl,Br,I)
3	CdX ₃ ⁻ (solventes no acuosos, X= F, Cl,Br, I)
4	CdS ₂ (CdS ₄), CdCl ₂ (biuret) ₂ (CdCl ₂ O ₂), CdCl ₂ tu ₂ (CdCl ₂ S ₂), CdCl ₂ py ₂ (CdCl ₂ N ₂), CdCl ₂ (Ph ₃ P) ₂ (CdCl ₂ P ₂), Cd(HCO ₂) ₂ tu ₂ (CdO ₂ S ₂)
5	[Co(NH ₃) ₆][CdCl ₅] [CdCl ₅], Cd(S ₂ CNEt ₂) ₂ [CdS ₅], CdSO ₄ tu ₃ (CdS ₄ O), Cd(thioglicolate) ₂ [CdS ₄ O], CdI ₂ (py-N-oxido) CdI ₃ O ₂
6	CdO{CdO ₆ }, [Cd(H ₂ O) ₆]{CDO ₆ }, Cd(acac) ₂ {CdO ₆ }, [Cd(imidazol) ₆](NO ₃) ₂ {CdO ₆ }, [Cd(en) ₃]S ₂ O ₃ {CdN ₆ }, NH ₄ CdCl ₃ {CdCl ₆ }, RbCdBr ₃ {CdBr ₆ }, CdCl ₂ {urea} ₂ {CdCl ₄ O ₂ }, CdCl ₂ {imidazol} {CdCl ₅ N}, CdBr ₂ py ₂ {CdBr ₄ N ₂ }, Cd(NCS) ₂ {CdN ₂ S ₄ }, Cd(glicenato) ₂ H ₂ O {CdO ₄ N ₂ }, Cd(L-metioninato) ₂ {CdO ₄ N ₂ }, Cd(L-metioninato) ₂ {CdO ₄ N ₂ }, Cd(histidinato) ₂ {CdO ₂ N ₄ }
7	Cd (MeCO ₂) ₂ 2H ₂ O{CdO ₇ }, Cd(salicilato) ₂ 2H ₂ O{CdO ₇ }, Cd (NO ₃) ₂ py ₂ {CdO ₄ N ₂ }, Cd (NO ₂) ₂ en {CdO ₄ N ₃ }
8	CdF ₂ {CdF ₈ }, Cd (NO ₃) ₂ 4H ₂ O{CdO ₈ }, Cd(maleato)2H ₂ O{CdO ₈ }, Cd(1,8-naphthpyridine) ₄ (CLO ₄) ₂ {CdN ₈ }

La geometría de coordinación depende de varios factores, tales como **la naturaleza del solvente**, que afecta la distribución de las especies involucradas en la solución. Por ejemplo, el Cd coordina muy bien a través de aniones de nitrógeno y azufre (SCN⁻) en el agua; **las longitudes de enlace** para cada ligando-Metal, por ejemplo, las distancias reportadas para Cd-N son de 2,298-2.384 Å, las cuales pueden ser mayores o menores en comparación a otros tipos de ligando-Metal y el **medio de coordinación** que puede ser líquido, sólido, y gaseoso.

Para el Cd se han identificado arquitecturas poliméricas 1D, 2D y 3D, y por medio de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se han identificado diferentes estructuras de coordinación entre el Cd²⁺ con diferentes ligandos tales como ligandos de oxígeno (Cd²⁺-O- donador), ligandos de azufre (Cd²⁺-S- donador), ligandos de nitrógeno (Cd²⁺-N- donador) y complejos multinucleares. Para cada ligando se han reportado diferentes constantes de estabilidad (k) de las cuales se observa mayor afinidad del Cd²⁺ a átomos de azufre (S) generando enlaces más fuertes, alta afinidad del Cd²⁺ por grupos nitrogenados especialmente cuando decrece el número de coordinación, y para átomos de oxígeno unidos a grupos carbonilos se resalta una interacción mucho más débil. Para cada complejo (ligando-Metal) se resaltan algunas diferencias tales como: enlace de covalencia y longitud de enlace entre otras. El enlace de covalencia varía de acuerdo con el solvente empleado en la solución, por ejemplo, estudios de RMN y FI indican que en agua y metanol la covalencia del enlace Metal-O varía para Hg, Cd y Zn donde Hg<Cd<Zn. Con respecto a la longitud de enlace se han reportado longitudes de Cd-S (2,527 Å) y Cd-N (2.298-2.384 Å) entre otras.¹⁰⁹ Para el grupo tioeter (R1-S-R2) no se ha reportado coordinación con Cd²⁺.¹⁰⁹

Según lo reportado por Borsari¹⁰⁹ algunos compuestos como [Cd₃(C₂O₄)₂(2,2'-bpy)₅](ClO₄)₂ exhiben intensa fluorescencia. Los efectos de quenching y fluorescencia se explican mediante los mecanismos de transferencia donador-aceptor. El quenching (disminución de fluorescencia) se atribuye a la formación de complejos de transferencia de carga entre un fluoroforo rico en electrones y una molécula con deficiencia de electrones, mientras que la fluorescencia tiene lugar porque el fluoroforo tiene menos electrones que la molécula. Además, La intensidad de emisión depende de la concentración del fluoroforo y cambia con el solvente debido a que el espectro UV-Vis cae en el rango del espectro de excitación.

Los sensores reportados para detección de Cd²⁺ se han desarrollado en soluciones acuosas¹⁶⁵ abriendo paso a nuevos métodos y configuraciones como potencial aplicación para la detección de diferentes contaminantes en aguas contaminadas con fines de consumo. Duan et.al¹⁶⁶ resaltan el uso de estos sensores porque son

altamente selectivos, simples y económicos. En otras matrices ambientales como suelo y plantas el desarrollo de sensores moleculares basados en fluorescencia para detección de Cd^{2+} es un tema vigente de trabajo con pocos reportes hasta la fecha y con amplia proyección para los próximos años.^{167,168}

En Xu et.al¹⁶⁷ se reporta el primer sensor radiométrico colorimétrico y fluorescente para detección de ácido fosfatasa (ACP) como indicador de contaminación en suelos por Cd. En el desarrollo del sensor emplearon nanoclusters de oro (Au-NCs) sintetizados con nano-láminas de MnO_2 para formar nanocompuestos 2D de Au-NCs/ MnO_2 . La oxidación producida por las nano-láminas de MnO_2 permitió un cambio de color de azul a amarillo y generó quenching. Los cambios de color y fluorescencia se evaluaron en términos de los cambios presentados en el ácido fosfatasa (ACP) en función de diferentes concentraciones de Cd.

En Gorbatov et.al¹⁶⁸ se reporta un sensor molecular tipo PET basado en compuestos químicos "BODYPI" para detección de iones de Zn^{2+} en células de la rizodermis de raíces de plantas "*Brasica napus*" cultivadas en suelos altamente contaminado por Zn, Cd, Co, Cu, Ni, Pb y Al. En los análisis de fluorescencia se identificó la capacidad del sensor para detectar específicamente iones de Zn^{2+} en comparación a los otros iones con alta especificidad.

De otra parte, en Wang et.al¹⁶⁹ se reporta un sensor fluorescente colorimétrico basado en emisión inducida por agregación (AIE). Es sensor se preparó con nanoclusters de oro estabilizados con glutatión de emisión naranja (AuNC) con óxido de grafeno funcionalizado con etilendiamina de emisión azul (EDA-GO) y finalmente introdujeron iones de cobre para apagar la emisión naranja. En presencia del Cd^{2+} se produce la agregación de Cu^{2+} -GSH-AuNC generando un cambio de color de azul a rojo de acuerdo con el límite de detección. Para la detección *In situ* se emplearon tiras de papel fluorescente integradas con la plataforma de un teléfono inteligente para detección de Cd^{2+} en muestras de arroz compradas en supermercados. Las muestras de arroz empleadas en este experimento fueron sometidas a diferentes concentraciones de Cd dentro del laboratorio. El esquema de desarrollo del sensor se muestra en la **Figura 27**.

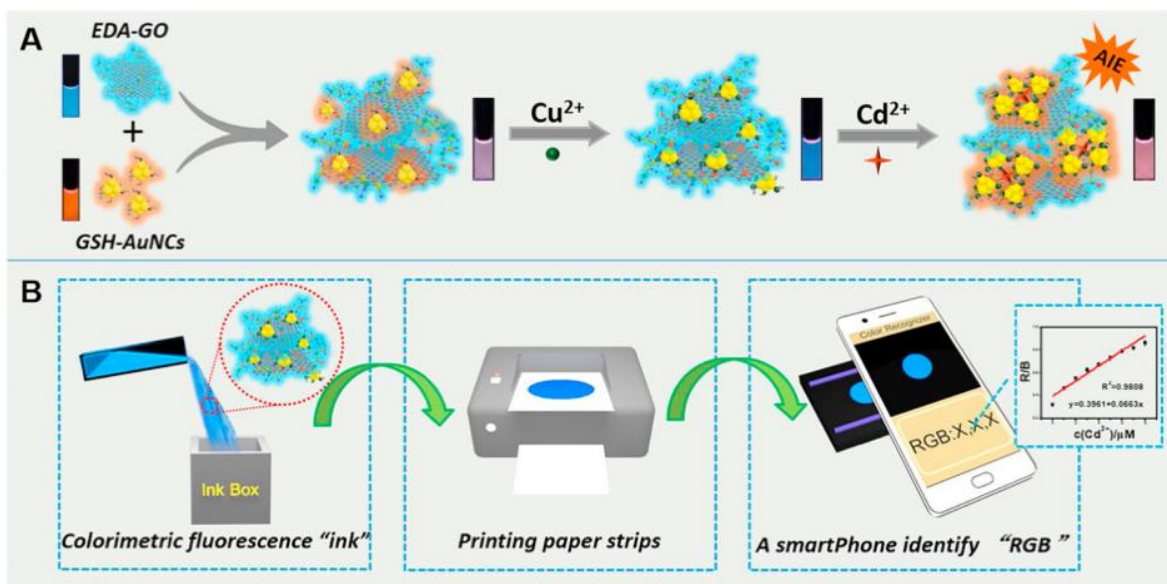


Figura 27. Esquema del sensor fluorescente colorimétrico reportado por Wang et.al169 para detección de Cd^{2+} en granos de arroz puestos a diferentes concentraciones de Cd.

El trabajo reportado por Wang et.al.¹⁶⁹ es el primer sensor aplicado directamente sobre muestras vegetales, sin embargo, las concentraciones de detección no son propias del proceso de bioacumulación de la planta lo cual sugiere que el estudio de bioacumulación es de vital importancia para hacer mediciones *In situ* de metales pesados en muestras vegetales.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Materiales

Los reactivos empleados para el estudio experimental de sensado molecular fueron los siguientes: Quinolina yellow ($C_{18}H_{11}NO_2$) con un contenido de colorante del 95%, Rodamina B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$), Rodamina 6g($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$) con un contenido de colorante de 99% Diethylenetriamine (DETA)-ReagentPlus 99%. Estos reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Cd standard for IC, 1000 mg/L en agua, Hg standard for IC, 1000 mg/L en agua, Zn standard for IC, 1000 mg/L en agua, Pb standard for IC, 1000 mg/L en agua, Cu standard for IC, 1000 mg/L en agua, proporcionados por nanoCiTec. Los solventes fueron: agua mili-Q, Conductividad 15.8, Etanol-alcohol etílico absoluto para análisis EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur. Las soluciones se prepararon en viales de vidrio de 10ml y 20ml respectivamente. La limpieza de los viales se realizó con agua milli-Q, haciendo uso de ultrasonido a una temperatura de 50°C durante 30min y secado en horno industrial a temperatura de 80°C durante 24h.

5.3.2 Configuración del sensor molecular

Para el estudio, se seleccionaron fluoroforos quinolina Yellow (QY) y rodamina B (RB) y molécula Diethylenetriamine con grupos funcionales afines al Cd^{2+} .

5.3.2.1 Estudio de fluorescencia para quinolina Yellow y rodamina B en solventes de agua mili Q y Etanol.

Inicialmente se preparó la quinolina yellow y la rodamina B en agua mili Q y etanol (etOH) a una concentración de 0,001M. De cada solución: quinolina yellow en agua (QYH), quinolina yellow en etOH (QYOH), rodamina B en agua (RBH) y rodamina B en etOH (RBOH) se prepararon cuatro soluciones de 2ml con concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 μ g/l. Las concentraciones empleadas para cada solución se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Concentraciones empleadas para preparar soluciones en agua y EtOH de fluoroforos (quinolina Yellow y Rodamina B) a concentraciones de 1-10-100 y 1000 μ g/l

Concentración (μ g/l)	Fluoroforo en Agua/EtOH a 0,001M (ml)	Solvente (Agua/EtOH) (ml)	Σ (ml)
1	0,002	1.998	2
10	0,02	1.980	2
100	0,2	1.800	2
1000	0	2.000	2

Cada solución fue agitada en ultrasonido a temperatura ambiente (25°C) durante 20min. Por Cada solución (ver **Figura 28**) se obtuvieron 3 análisis de los espectros de absorbancia, espectros de emisión y excitación para identificar las concentraciones de mayor intensidad. Teniendo en cuenta el promedio de resultados, se identificaron las mayores intensidades de fluorescencia por cada fluoroforo.

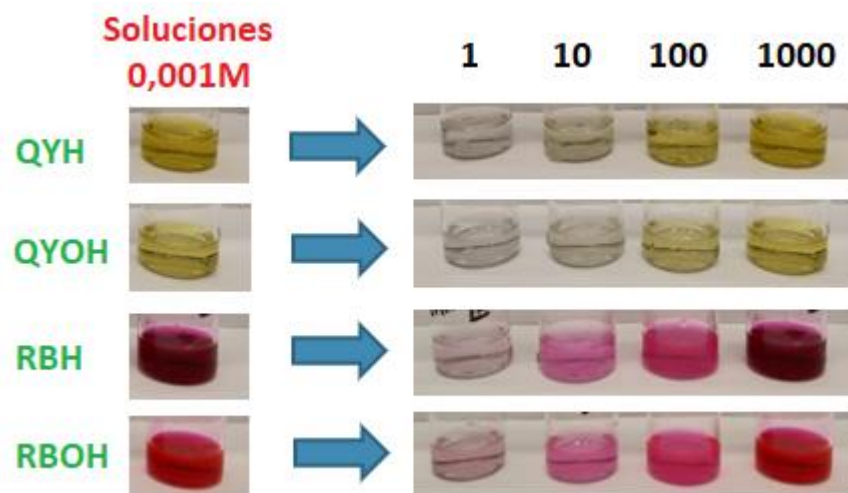


Figura 28. Esquema de preparación de fluoroforos (Quinolina Yellow y Rodamina B) a concentraciones de 1-10-100-1000µg/l en agua mili Q y EtOH.

5.3.2.2 Estudio de fluorescencia para quinolina Yellow y rodamina B con molécula DETA

Para identificar la influencia de la molécula DETA se prepararon inicialmente tres concentraciones arbitrarias de los fluoroforos de mayor intensidad con DETA a volúmenes de radio de 90-10%, 80-20% y 70-30%. Para cada solución con volumen de 2ml y concentraciones tal como se indica en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Valores de concentración de fluoroforo disuelto en agua (FH) o etOH (FOH) con molécula DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%

Radio de volumen FH/FOH + DETA	Solución de FH ó FOH	DETA
90-10%	1.8ml	0,2ml
80-20%	1.6ml	0.4ml
70-30%	1.4ml	0.6ml

Las soluciones fueron agitadas en ultrasonido a temperatura ambiente (25°C) durante 20min y para cada radio de volumen se obtuvieron los espectros de absorbancia y espectros de emisión y excitación de fluorescencia.

5.3.2.3 Caracterización radiométrica del fluoroforo de seleccionado en presencia de DETA a diferentes concentraciones de Cd

Una vez se identifica la solución de fluoroforo-DETA que brinda mejores resultados para detección *In situ* de Cd²⁺, se procede a preparar soluciones de con concentraciones de Cd²⁺ a 1-10-100 y 1000 µg/l. Las concentraciones empleadas por cada solución se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Valores de concentración de fluoroforo-DETA a concentraciones de Cd entre 1 a 1000µg/l

Concentración Cd ²⁺ (µg/l)	Fluoroforo-DETA (µl)	Cd ²⁺ (µl)	Σ (ml)
1	1998	2	2
10	1980	20	2
100	1800	200	2
1000	1000	1000	2

Las soluciones fueron agitadas en ultrasonido a temperatura ambiente (25°C) durante 20min y para cada solución se obtuvieron los espectros de absorbancia y espectros de emisión y excitación de fluorescencia.

5.3.2.4 Estudio de intensidad de la solución seleccionada a diferentes valores de pH

Para identificar la influencia del pH en las soluciones del fluoroforo-Solvente, se prepararon soluciones con valores de pH entre 2-10. Se seleccionó el pH de mayor intensidad de emisión y se repitieron procedimientos 6.3.2.1 y 6.3.2.2 (**Nota.** La variación del pH se realiza para la solución del fluoroforo-solvente porque la molécula DETA es altamente reactiva a ácidos fuertes como el ácido sulfúrico).

5.3.2.5 Selectividad

Finalmente se seleccionó la solución fluoroforo-DETA con su respectivo pH que brindó mejores resultados para detección *In situ* de Cd²⁺ y se evaluó selectividad con los cationes Zn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ y Cu²⁺. Se seleccionaron estos cationes porque el Zn y Hg se encuentran en el mismo grupo de la tabla periódica del Cd, además el Zn puede afectar la selectividad del Cd. Por otro lado, el Pb y Cu son metales que se bioacumulan en diferentes especies de plantas.

5.3.3 Mediciones de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia

Los espectros de absorbancia UV-VIS fueron tomados con el Espectrofotómetro - UV-2600 – Shimadzu UV/Visible. Los espectros de emisión y excitación de fluorescencia fueron tomados con el Espectrómetro de fluorescencia -RF 6000- Shimadzu. Para la quinolina se tomaron espectros entre 200 a 700nm y para la rodamina B el rango de análisis fue de 400-700nm. La selección de rangos se toma en cuenta a partir de las especificaciones de Sigma Aldrich para cada fluoroforo y se complementa con diferentes reportes académicos.^{141,170} Los equipos empleados se muestran en la **Figura 29**.

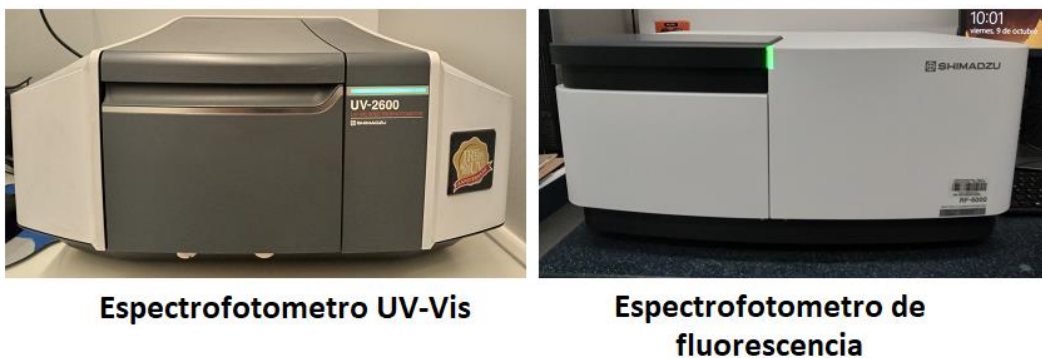


Figura 29. Espectrofotómetro UV-Vis y espectrofotómetro de fluorescencia empleados para medición.

Para el análisis de emisión y excitación se emplearon cubetas de fluorescencia de poliestireno (Fluorimeter cuvettes, polystyrene) compradas en Sigma Aldrich. Para cada análisis se tomaron 3 repeticiones y se determinó el valor promedio obtenido para análisis.

5.4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.4.1 Preselección de fluoroforos y molécula

Para la configuración del sensor se seleccionaron dos fluoroforos Quinolina Yellow y Rodamina B) y la molécula Diethylenetriamine (DETA). La selección se realizó teniendo en cuenta la presencia de grupos aminos en su estructura molecular. El catión Cd^{2+} presenta alta afinidad a grupos aminos y ésta característica es de gran importancia para la selectividad del sensor.^{39,109,113}

Quinolina Yellow. La quinolina es un colorante sintético de color amarillo soluble en agua comúnmente empleado como colorante en alimentos. La quinolina yellow también conocida como amarillo de quinolina tiene una fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_{5/8/11}\text{S}_{1/2/3}\text{Na}_{1/2/3}$, una masa molar de 477,38 g/mol y su estructura molecular se compone de dos cetonas (-CO-) y una amina terciaria como se muestra en la **Figura 30**.

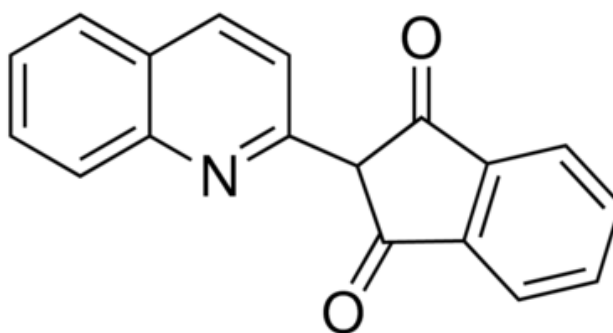


Figura 30. Estructura molecular Quinolina yellow

La quinolina y sus derivados han sido empleados en el desarrollo de sensores moleculares fluorescentes tipo PET e ICT para detección de iones de Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cr^{3+} y Fe^{3+} entre otros en soluciones acuosas.¹⁴¹ Para muestras biológicas tales como células vivas, la quinolina también ha sido empleada para detección de Zn^{2+} , glutatión y cisteína en mitocondrias entre otros.^{164,171,172}

Los fluoróforos derivados de quinolina (*8-aminoquinolina*, *hydroxyquinolina*, *isoquinolina*) han sido usados para el desarrollo de sensores para detección de Zn^{2+} porque son altamente solubles en agua y muestran buena selectividad con el Zn^{2+} . En el desarrollo de estos sensores se considera la selectividad del Cd^{2+} .¹⁴² Para detección de Cd, en Xue et.al¹⁷³ se ha reportado configuraciones de sensado molecular basado en ICT con uso de *4-isobutoxy-6-(dimethylamino)-8-methoxyquinaldine*. Este tipo de configuración presenta alta sensibilidad para Cd^{2+} ($K_d=51pM$) y alta sensibilidad frente a Zn^{2+} y otro tipo de iones. En Sun et.al¹⁶⁴ se presenta un sensor radiométrico fluorescente basado en el grupo *6-(dimethylamino)* para sustituir el esqueleto de la quinolina y 2-hydrazinopyridine para quelar el Cd^{2+} en células vivas.

Rodamina B. La rodamina B es un compuesto químico derivado de la familia de las rodaminas. Su estructura molecular se compone de 4 grupo metil (CH_3), 1 hidroxido (OH) y 2 etilamina (CH_3-NCH_3) como se ilustra en la **Figura 31**. Su uso es de gran interés para el desarrollo de sensores moleculares porque el cambio de fluorescencia presenta diferentes propiedades foto físicas como longitudes de onda de absorción y emisión, gran coeficiente de absorción, gran foto estabilidad y excelentes propiedades espectroscópicas como alto rendimiento cuántico de fluorescencia, además permite la activación de fluorescencia para variados analitos con diferentes configuraciones.^{170,174}

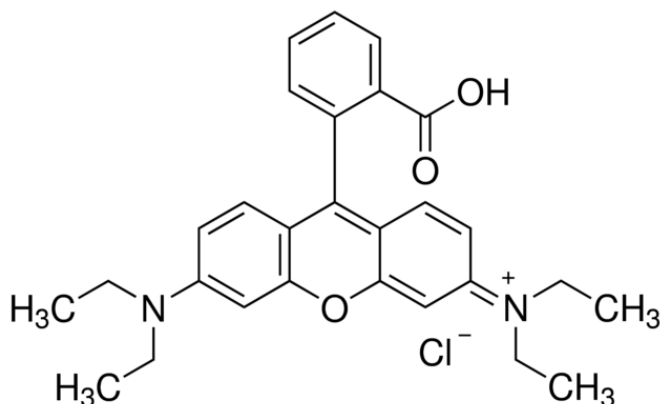


Figura 31. Estructura molecular Rodamina B.

La rodamina B ha sido empleada como fluoróforo en quimiosensores tipo PET con diferentes configuraciones siendo el uso de la hidraxina-Rodamina B una de las más reportadas para la detección de metales pesados tales como: Au^{3+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} .^{135,141,174,175}

Molécula Diethylenetriamine (DETA). La Diethylenetriamine es un compuesto orgánico conocido también como 2,2'iminodi el cual se compone de 3 átomos de nitrógeno donantes, 2 grupos amino primario terminales y un grupo amino central secundario.¹⁷⁶ Su estructura molecular se muestra en la **Figura 32**.

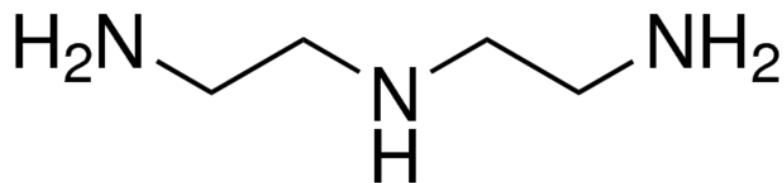


Figura 32. Estructura molecular de la Diehyleneetriamine.

La diethylenetriamine ha sido empleada en sensores moleculares fluorescentes para detección de metales pesados y otros componentes. Geng et.al.¹⁷⁷ reportaron un sensor molecular fluorescente tipo PET empleando diethylenetriamine y Rodamina B para detección de Fe³⁺ y Cr³⁺ en soluciones acuosas. También se han encontrado trabajos que reportan el uso de DETA con Rodamina B para detección de metales pesados tales como Zn²⁺ y Cu¹⁺ u otros elementos como aminoácidos (cisteína y homocisteína) en ambientes celulares.^{141,172,178,179}

5.4.2 Estudio de fluorescencia para quinolina Yellow y rodamina B disuelta en agua mili Q y Etanol.

Los resultados de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia para cada solución: quinolina yellow disuelta en agua (QYH), quinolina yellow disuelta en etOH (QYOH), Rodamina B disuelta en agua (RBH) y Rodamina B disuelta en etOH (RBOH) se muestran a continuación:

8

5.4.2.1 Mediciones de absorbancia de quinolina yellow y Rodamina B a concentraciones de (1-10-100-1000 µG/L) EN agua mili Q y Etanol (EtOH)

Los resultados de absorbancia, emisión y excitación para cada fluoroforo se muestran en la **Tabla 18** y **Tabla 19**.

Tabla 18. Mediciones de absorbancia de quinolina yellow y rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disueltos en solventes: agua y etOH

FLUOROFORO	SOLVENTE	NOTACIÓN	Concentración de fluoroforo			
			1	10	100	1000
quinolina Yellow	Agua	QYH	-0,805	-0,652	1,6	2,58
quinolina Yellow	EtOH	QYOH	-0,736	-0,687	1,051	2,035
Rodamina B	Agua	RBH	0,064	0,608	-	-
Rodamina B	EtOH	RBOH	0,116	0,663	-	-

Con respecto a las longitudes de onda (ver **Tabla 19**) se puede observar que la quinolina yellow no muestra cambios a concentraciones entre 1 y 10 µg/l, mientras que a concentraciones entre 1-10, 100 y 1000 µg/l se observa corrimiento hacia el rojo para cada solvente. Para la rodamina B a concentraciones de 1 y 10 µg/l se observa corrimiento hacia el azul en la longitud de onda para la solución en agua y corrimiento hacia el rojo para la solución en etOH.

Tabla 19. Wavelength (nm) de mediciones de absorbancia de quinolina yellow y rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disueltos en solventes: agua y etOH

FLUOROFORO	SOLVENTE	NOTACIÓN	Wavelength (nm)			
			1	10	100	1000
quinolina Yellow	Agua	QYH	283,5	283,5	289,5	295,5
quinolina Yellow	EtOH	QYOH	283,5	283,5	291,5	295,5
Rodamina B	Agua	RBH	554	552,5	-	-
Rodamina B	EtOH	RBOH	545	553	-	-

Las gráficas de absorbancia para la quinolina yellow varían para cada solvente como se muestra en la **Figura 33**. Los mayores picos de intensidad se observan a una concentración de 1000µg/l, aunque en agua se observa la mayor concentración.

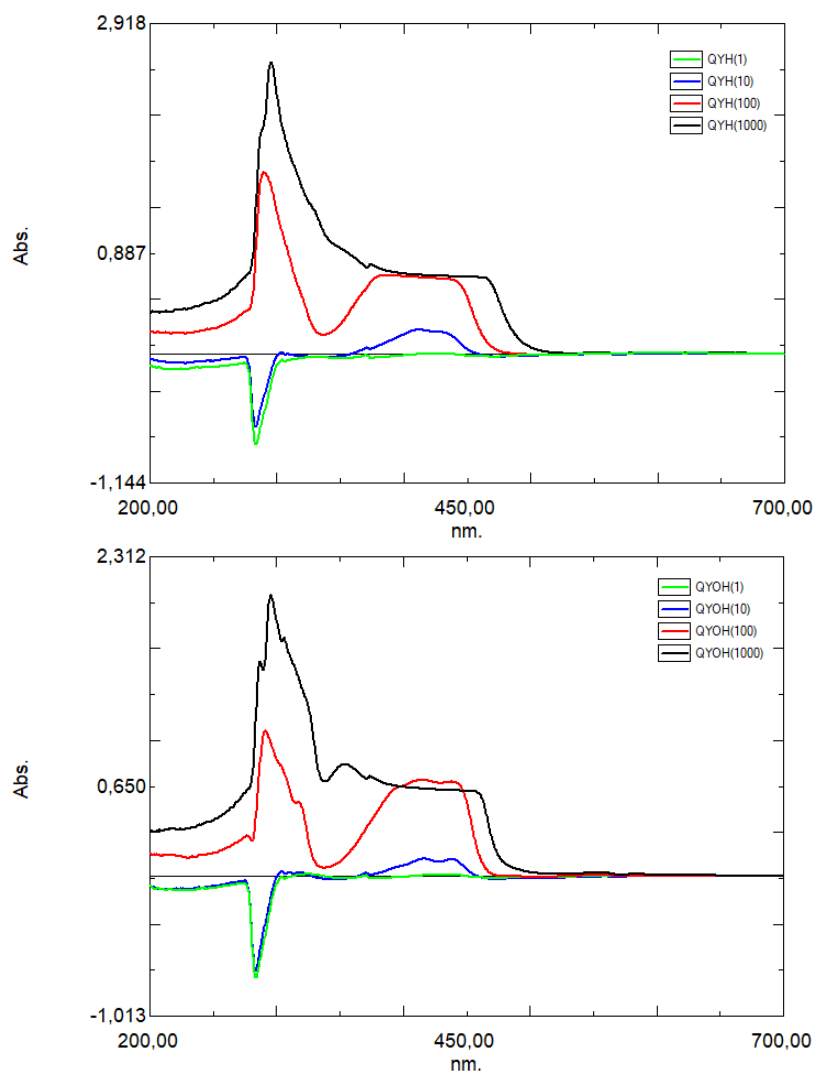


Figura 33. Mediciones de Quinolina yellow a concentraciones entre 1 y 1000µg/l, disuelta en agua (QYH) y etOH (QYOH).

Para la rodamina B los mayores picos se observan a concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/l}$ por cada solvente. A diferencia de la quinolina yellow, el mayor pico de absorbancia se observa en etOH, mientras que a concentraciones de 100 y 1000 $\mu\text{g/l}$ se observan picos distorsionados, esto puede ocurrir porque la intensidad de la fluorescencia se ve afectada por la intensidad de la luz del espectrofotómetro y la distorsión se ve reflejada en el espectro. Los resultados se muestran en la **Figura 34**.

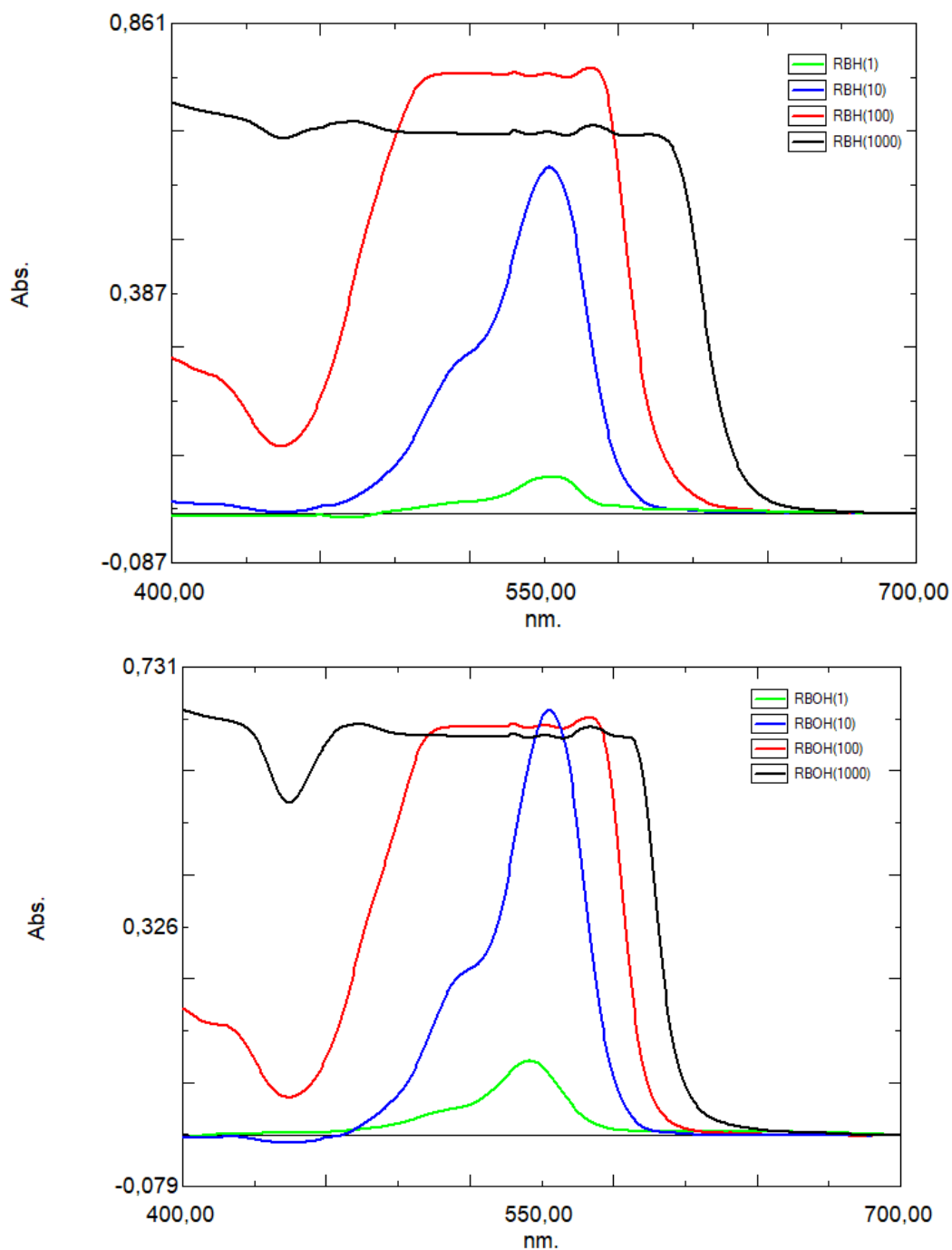


Figura 34. Mediciones de Rodamina B a concentraciones entre 1 y 1000 $\mu\text{g/l}$, disuelta en solventes de agua (RBH) y etOH (RBOH).

5.4.2.2 Espectros de Emisión y Excitación de fluorescencia para quinolina yellow y rodamina B a diferentes concentraciones 1-10-100 y 1000µg/l en solventes de agua mili q y etanol (etOH).

En la **Tabla 20** se indican los valores máximos de intensidad para cada espectro, obtenidos para cada fluoroforo (quinolina yellow y rodamina B) con los respectivos solventes (Agua mili Q y etOH) y las diferentes concentraciones (1-10-100 y 1000 µg/l).

Tabla 20. Resultados de emisión y excitación en unidades arbitrarias de fluorescencia para fluoroforos a diferentes concentraciones disueltos en agua mili Q y etOH.

Fluoroforo	Solvente	Notación	Espectro	1	10	100	1000
Quin-yellow	Agua mili Q	QYH	Emisión	38,295	20,187	18,984	90,166
			Excitación	99,63	36,363	53,927	545
Rod B		RBH	Emisión	1688,349	12096,11	6321,887	800
			Excitación	44935,87	171915,967	0	0
Quin-yellow	etOH	QYOH	Emisión	901,45	570,073	545,132	1041,368
			Excitación	4583,141	3106,859	0	0
Rod B		RBOH	Emisión	4041,319	19096,938	15645,556	6446,493
			Excitación	0	0	0	0

De estos resultados se observa que el máximo de emisión para la quinolina yellow se obtuvo a una concentración de 1000 µg/l con un valor de 90,116 U.A para la disolución en agua y un valor de 1041,368 U.A para la disolución en etOH. El máximo de excitación de fluorescencia se observa a una concentración de 1000µg/l para el agua con una intensidad de 545 U.A para la disolución en agua, mientras que en etOH no se obtuvieron resultados para las concentraciones de 100 y 1000 µg/l.

En la **Figura 35** se grafican los espectros de emisión y excitación de fluorescencia para QYH y en la **Figura 36** se muestran los espectros para QYOH. En la **Tabla 21** se muestran las longitudes de onda (wavelength) para cada fluoroforo con su respectivo solvente.

Tabla 21. variaciones de longitud de onda para fluoroforos a diferentes concentraciones disueltos en agua mili Q y etOH.

Fluoroforo	Solvente	Notación	Espectro	wavelength(nm)			
				1	10	100	1000
Quin-yellow	agua	QYH	Emisión	554	577	578	592
			Excitación	526	552	533	216,583
Rod B		RBH	Emisión	577	583	591	633
			Excitación	553	567	0	0
Quin-yellow	EtOH	QYOH	Emisión	574	573	574	569
			Excitación	551	551	0	0
Rod B		RBOH	Emisión	576	580	591	605
			Excitación	0	0	0	0

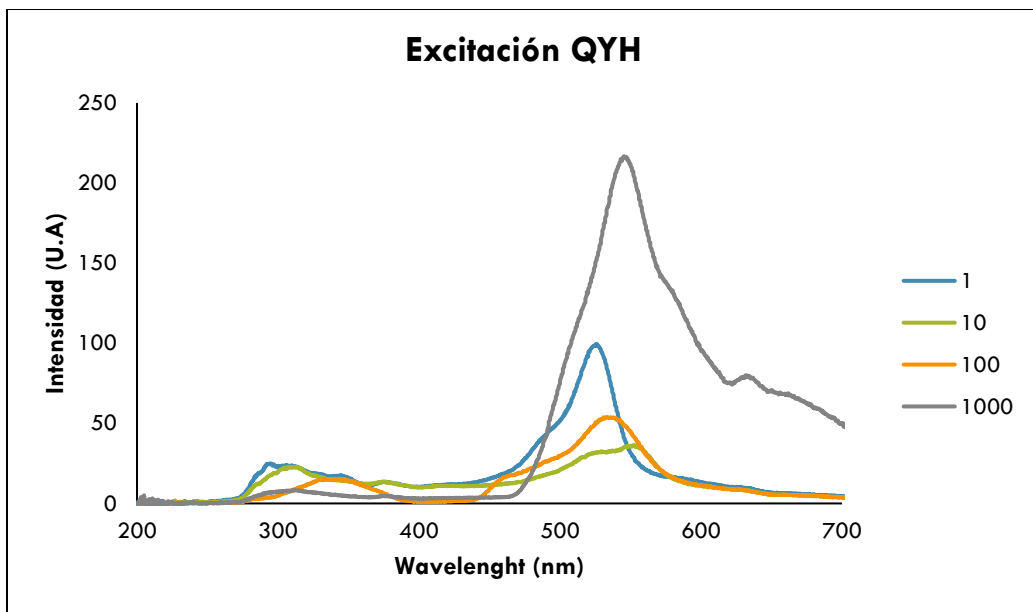
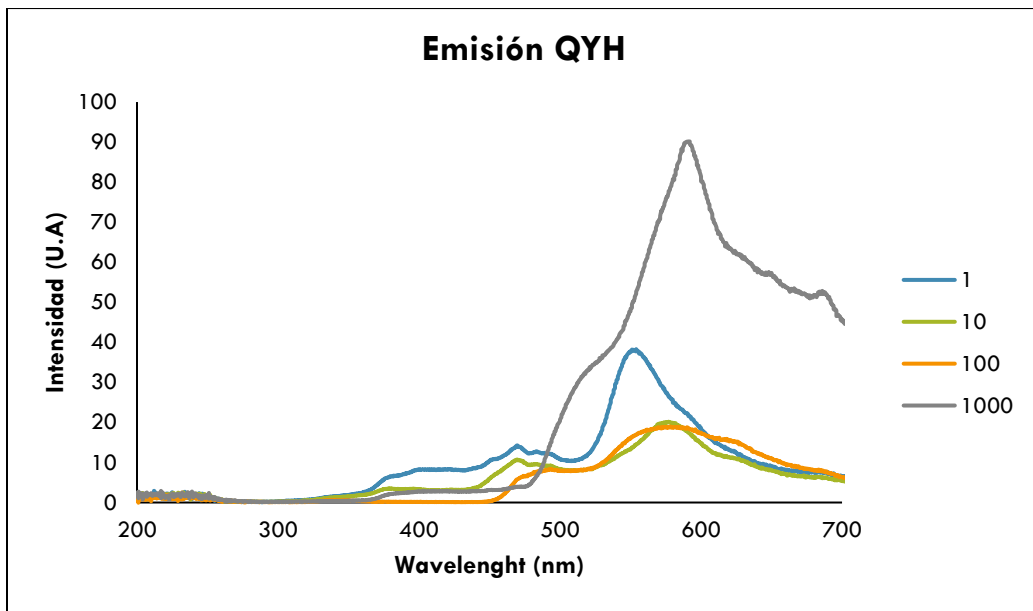


Figura 35. Espectros de Emisión y Excitación de Quinolina a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en Agua Mili Q (QYH).

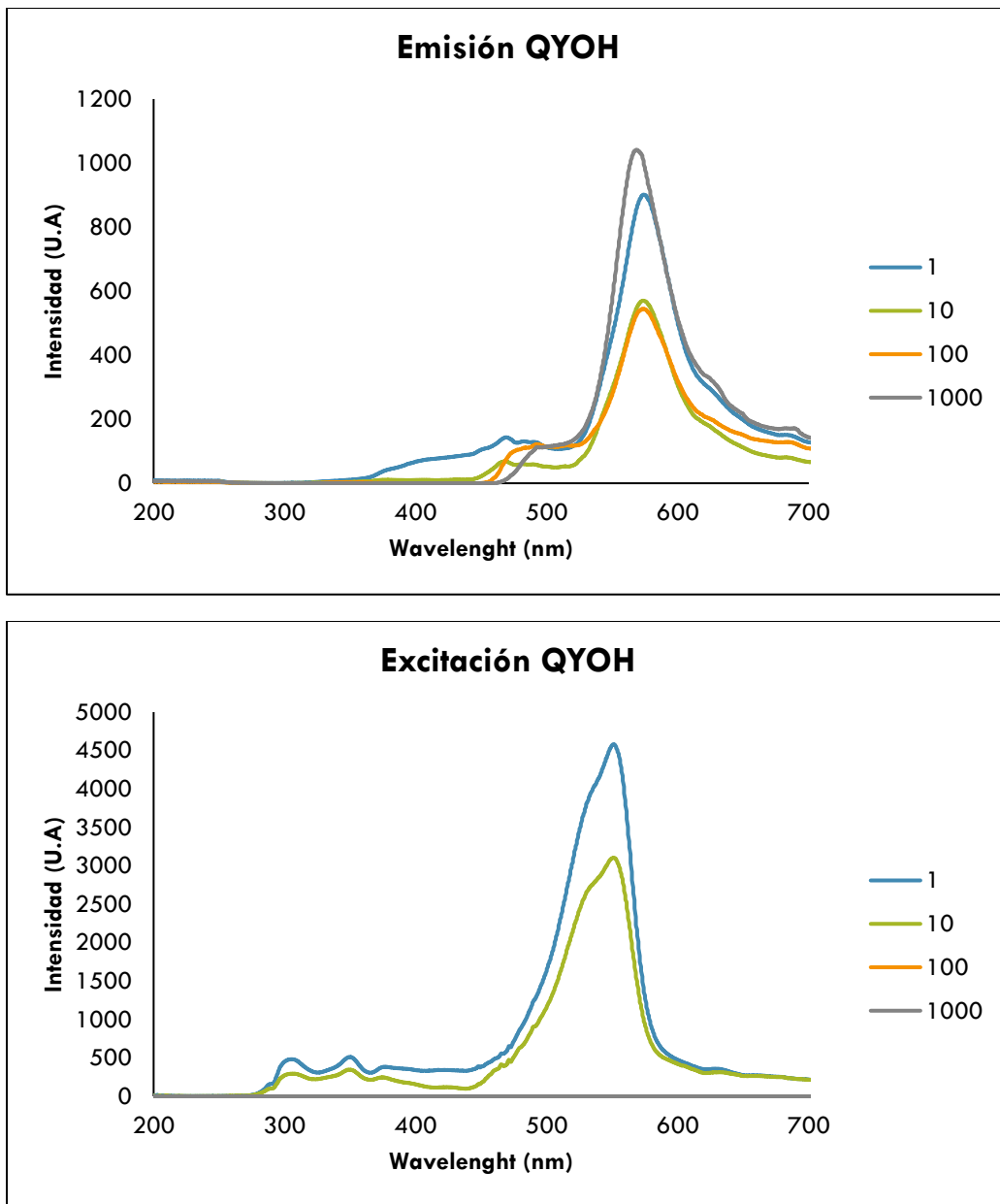


Figura 36. Espectros de Emisión y Excitación de Quinolina a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en EtOH.

Para la rodamina B se observa la mayor emisión en agua para una concentración de 10µg/l con un valor de 12096,11 U.A. En etanol la mayor intensidad se observa a una concentración de 1µg/l con un valor de 4583,14 U.A. El máximo de excitación se obtuvo a una concentración de 10µg/l en ambos solventes, para agua se alcanzó un valor de 171915,97 U.A y en etOH se alcanzó un valor de 19096, 938 U.A.

Al igual que la quinolina yellow se observaron corrimientos en la longitud de onda como se muestra en la **Tabla 21** y se observan en la **Figura 37** y **Figura 38** para respectivos solventes.

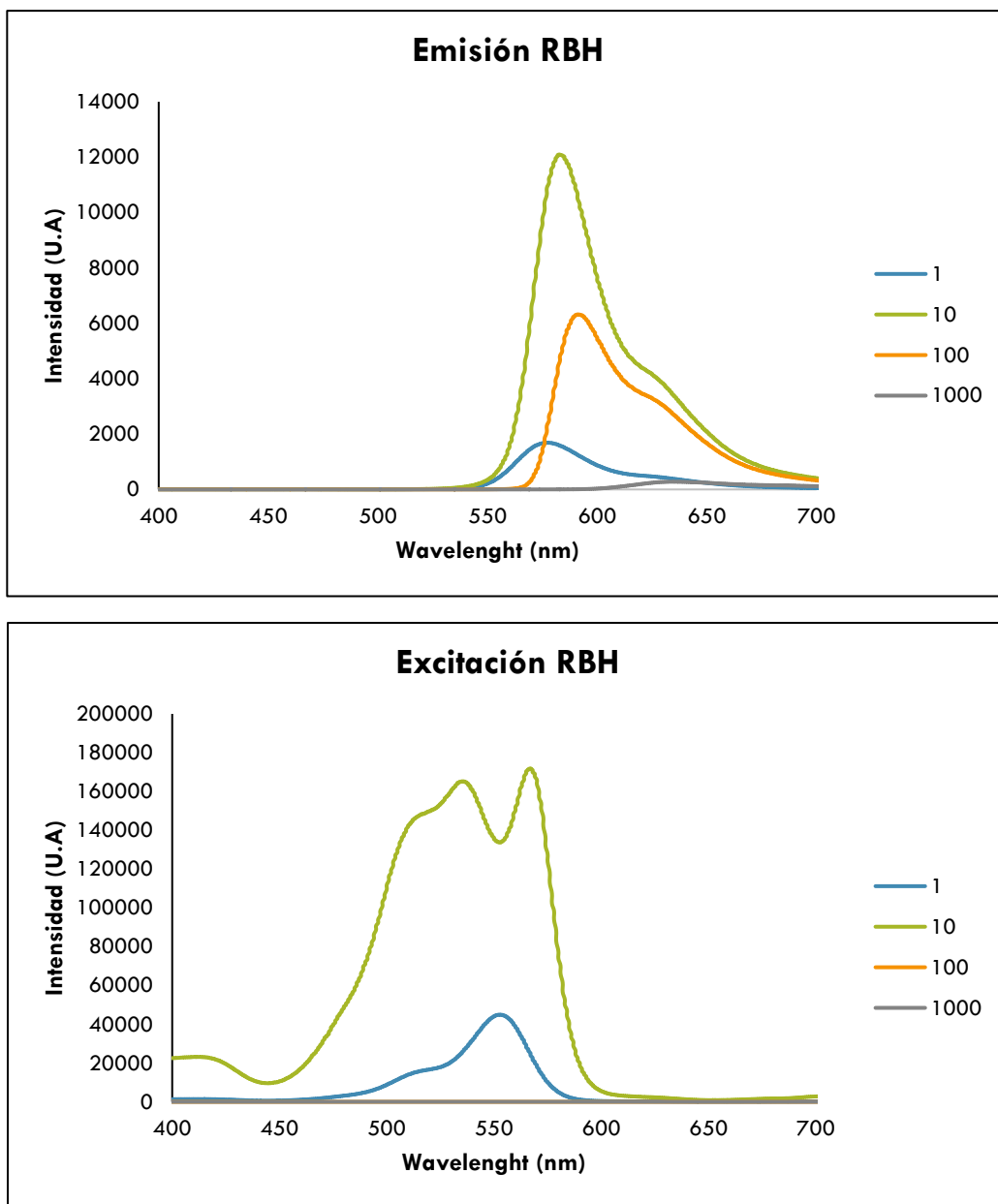


Figura 37. Espectros de Emisión y Excitación de Rodamina B a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en Agua Mili Q

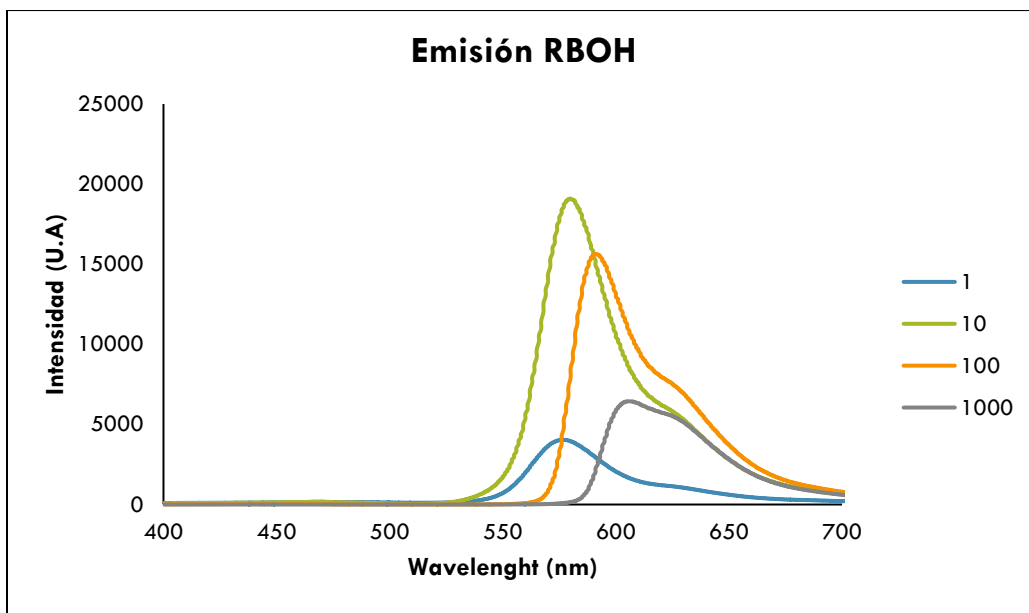


Figura 38. Espectro de emisión Rodamina B a diferentes concentraciones (1-10-100-1000µg/l) disuelta en EtOH.

Los resultados obtenidos para la quinolina yellow y para la rodamina B mostraron diferentes intensidades para cada solvente y mostraron variaciones de color como se muestra en la **Figura 39**. La quinolina yellow y la rodamina B obtuvieron mayores intensidades de emisión en EtOH en comparación al agua. El solvente es uno de los factores de mayor importancia en fluorescencia porque la polaridad del solvente genera los desplazamientos del máximo de absorción a mayores o menores longitudes de onda, dando lugar al proceso de relajación vibracional.^{149,180} Un causante de la pérdida de intensidad por quenching es la presencia de oxígeno. Por esta razón, cuando el solvente utilizado es agua, se hace necesario atender este factor. Además es importante resaltar que la quinolina yellow es soluble en agua y es altamente soluble en alcoholes como el metanol o etanol^{141,164} mientras que, La rodamina B es altamente soluble en agua.¹⁷⁰

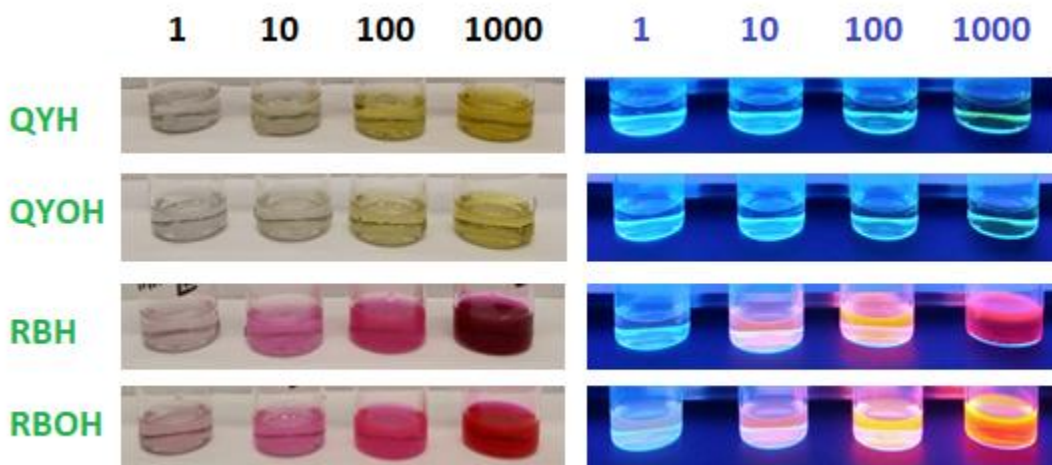


Figura 39. Fluoroforos disueltos en agua y etOH a diferentes concentraciones.

Los espectros de excitación para la rodamina B mostraron diferente forma, los resultados en agua mostraron un pico de intensidad a una concentración de 1µg/l mientras que para una concentración de 10µg/l se observan dos picos de intensidad. En el caso del etOH, no se obtuvieron picos de excitación, esta variación se puede explicar teniendo en cuenta la intensidad de la emisión de luz del espectrofotómetro con respecto a la excitación de las moléculas fluorescentes.

Para proceder con la caracterización del fluoroforo con la molécula DETA, se seleccionan las concentraciones de mayor intensidad de emisión de fluorescencia para cada solvente. Para la quinolina se selecciona la concentración de 1000µg/l y para la rodamina B se selecciona la concentración de 10µg/l porque alcanzan los mayores picos de intensidad de emisión de fluorescencia. Con respecto al solvente se selecciona el etOH porque permite obtener mayores intensidades de emisión de fluorescencia.

5.4.3 Estudio de fluorescencia para y con molécula DETA

Para identificar la influencia de la molécula DETA con las soluciones: Quinolina Yellow en alcohol (QYOH) y Rodamina B en etOH (RBOH) se prepararon inicialmente tres concentraciones arbitrarias de cada fluoroforo con DETA a radios de volumen de 90-10%, 80-20% y 70-30%.

La concentración de la molécula DETA es un parámetro de gran importancia para este trabajo porque permite identificar si la molécula afecta la fluorescencia del fluoroforo. Para la validación del trabajo es importante buscar una configuración de fluoroforo-molécula con baja intensidad de tal manera que la presencia del Cd active la fluorescencia y permita realizar una detección *In situ* en la planta.

5.4.3.1 Espectros de absorbancia para QUOH y RBOH con molécula DETA a radios de volumen de 90-10%; 80-20% y 70-30%

Los resultados de absorbancia para cada radio de volumen se muestran en la **Tabla 22** y los espectros de absorbancia se ilustran en la **Figura 40** para cada solución.

Tabla 22. Resultados de absorbancia para QYOH y RBOH con DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20%, 70-30%.

Notación	radio de volumen	abs (U.A)	wavelength (nm)
QYOH	90-10%	2,037	295,5
	80-20%	2,555	295,5
	70-30%	2,594	295,5
RBOH	90-10%	0,114	543
	80-20%	0,039	544
	70-30%	0,003	545

De los resultados se puede observar que la QYOH no presenta variaciones en la longitud de onda (295,5nm) y sus absorbancias aumentan en la medida que se incrementa la concentración de DETA (10%-30%). La RBOH, si presenta un corrimiento positivo de las longitudes de onda y los valores de las absorbancias disminuyen con la concentración de DETA.

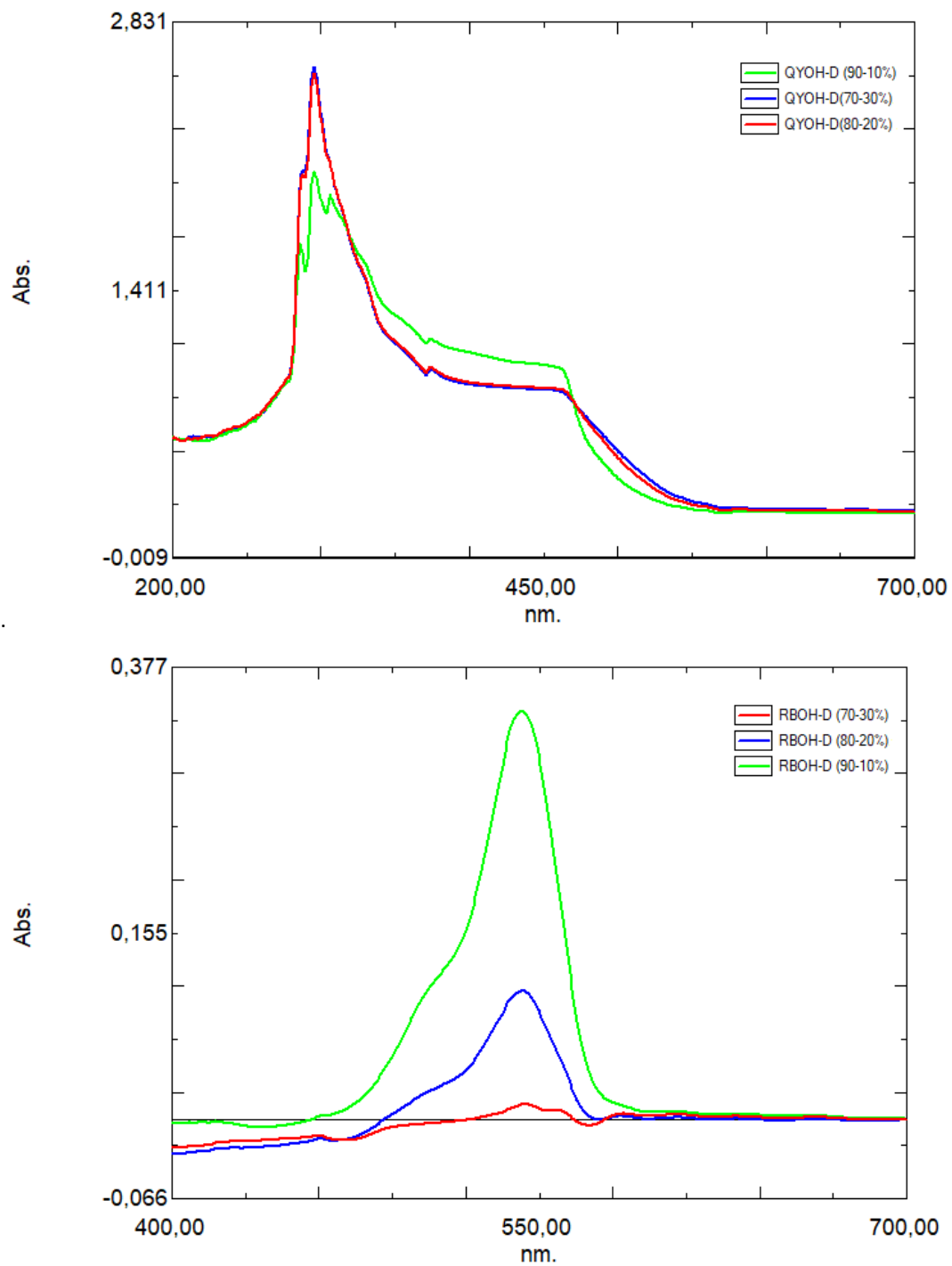


Figura 40. Espectros de absorbanca de QYOH y RBOH disueltas con DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%.

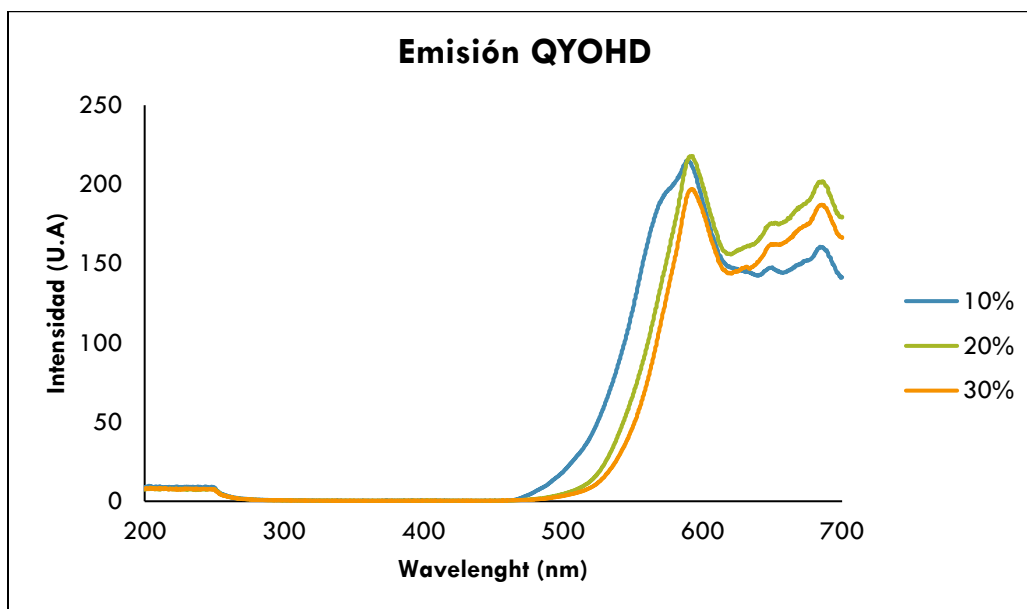
5.4.3.2 Espectros de Emisión y Excitación de QYOH y RBOH con molécula DETA a radios de volumen de 90-10%; 80-20% y 70-30%

Los resultados obtenidos para los espectros de emisión y excitación de fluorescencia para cada fluoroforo se muestran en la **Tabla 23** y las gráficas de los espectros se muestran en la **Figura 41** para QYOH y en la **Figura 42** para RBOH.

Tabla 23. Resultados de emisión y excitación para FH y FOH con DETA a a radios de volumen 90-10%, 80-20%, 70-30%.

fluoroforo	Notación	radio de volumen	emisión (U. A)	wavelenght (nm)	excitación (U.A)	wavelenght (nm)
quinolina yellow	QYOH	90-10%	214,964	590	10845,231	549
		80-20%	217,922	593	13414,662	589
		70-30%	197,113	592	744,381	589
Rodamina B	RBOH	90-10%	5506,604	569	31178,564	542
		80-20%	1377,31	567	7597,198	542
		70-30%	251,645	569	1338,154	540

De los resultados obtenidos, la QYOH disuelta con la molécula DETA (QYOH) muestra la mayor intensidad de emisión a un radio de volumen de 80-20% con un valor de 217,922 U.A. La RBOH-DETA (RBOH) muestra la mayor intensidad (5506,604 U.A) para un radio de volumen 90-10%. En ambas configuraciones (QYOH - RBOH) la menor concentración se obtuvo a un radio de volumen 70-30%. Con respecto a las longitudes de onda se observa un corrimiento positivo para QYOH, mientras que en la RBOH se observa un corrimiento negativo.



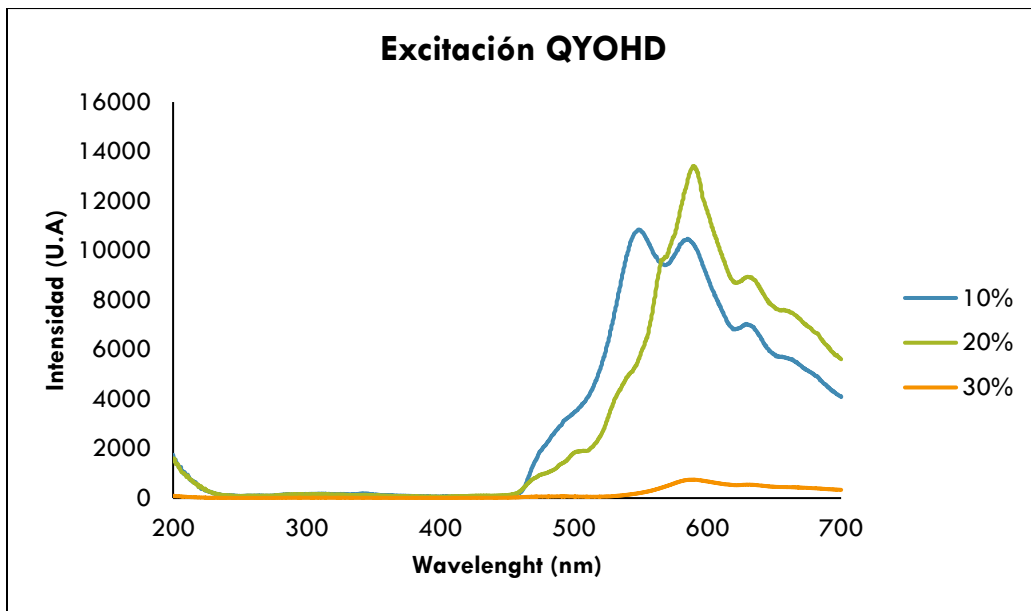
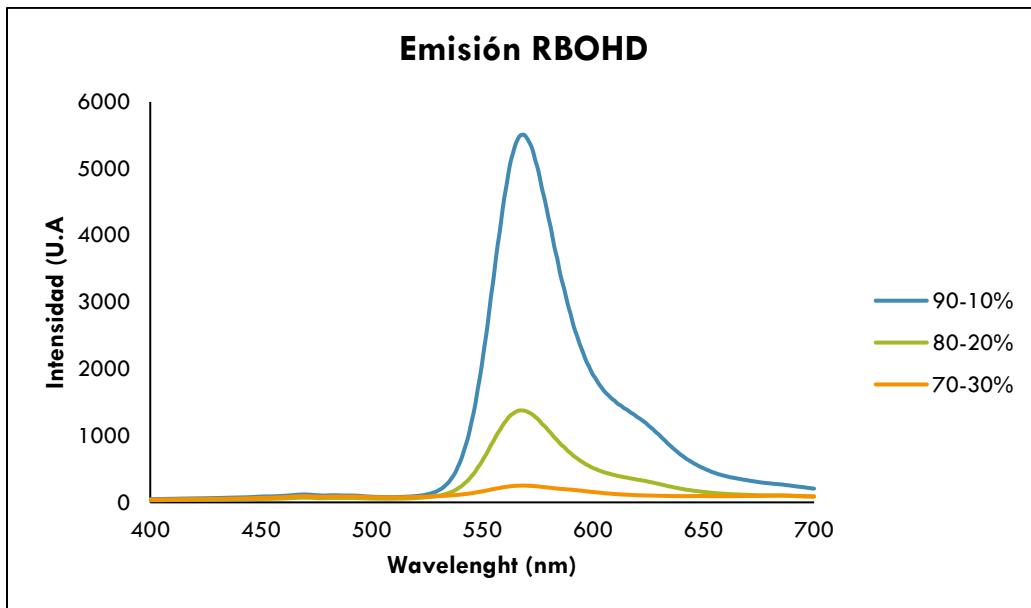


Figura 41. Espectros de Emisión y Excitación de QYOHD a radios de volumen (90-10%; 80-20%; 70-30%).

Para la RBOH se puede observar una disminución de los picos de intensidad de emisión y excitación en función del aumento en la concentración de la molécula DETA. Esto indica que la molécula desactiva la fluorescencia de la rodamina B.



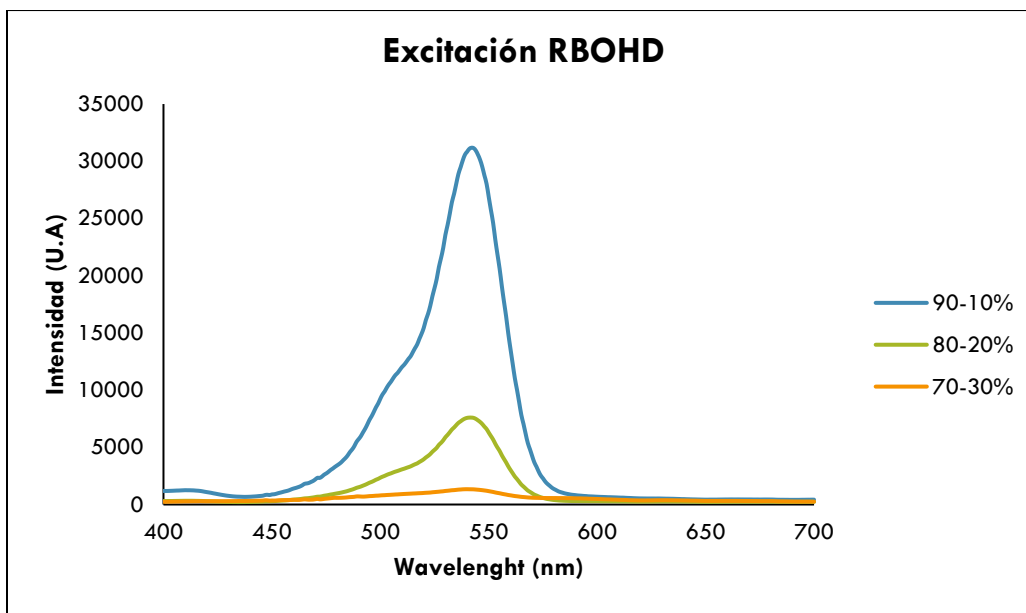


Figura 42. Espectros de Emisión y Excitación de RBOHD a radios de volumen (90-10%; 80-20%; 70-30%).

De estos resultados se observa que la molécula DETA genera una disminución en la intensidad de fluorescencia para cada solución de fluoroforos (QYOH, RBOH). Aunque la DETA es altamente soluble en agua y solventes orgánicos polares. En el caso del etanol se observó buena disolución, aunque no es un componente orgánico.

Adicional a las intensidades también se observaron cambios de tonalidad en la colorimetría de cada fluoroforo como se muestra en la **Figura 43**. Por ejemplo, la QYOH-D cambió su tonalidad de amarillo claro a amarillo opaco en presencia de la DETA a diferentes concentraciones, mientras que la tonalidad rosa de la RBOH disminuyó notablemente en las diferentes concentraciones de la DETA. Transcurridas 24h de la preparación de cada solución se observó que la QYOH-D mantiene su tonalidad constante, pero la RBOH-D queda completamente transparente para los diferentes porcentajes.

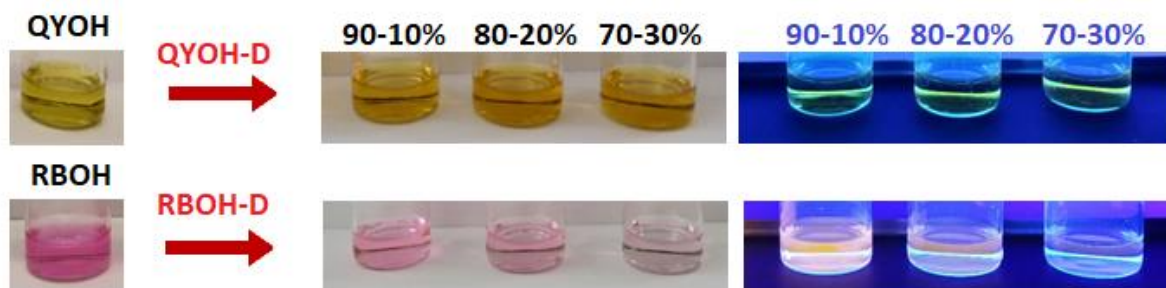


Figura 43. Colorimetría de soluciones de QYOH y RBOH con molécula DETA a radios de volumen 90-10%, 80-20% y 70-30%.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se selecciona la solución de RBOH-D a un radio de volumen 70-30% debido a que es la solución que muestra la menor intensidad en los espectros de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia. Además, el notable cambio de tonalidad que muestra la RBOH en función de la DETA es una característica de gran interés para identificar detección de Cd en plantas de interés.

5.4.4 Caracterización de RBOHD (70-30%) con Cd a concentraciones de 1-10-100 y 1000µg/l mediante espectros de absorbancia y espectros de emisión y excitación de fluorescencia

Se selecciona la solución RBOHD con radio de volumen 70-30% y se procede a caracterizar con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l). Los resultados de absorbancia y los espectros de emisión y excitación de fluorescencia se presentan a continuación:

5.4.4.1 Espectros de Absorbancia de QYHD, QYOHD, RBHD y RBOHD con Cd a concentraciones de 1-10-100 y 1000µg/l

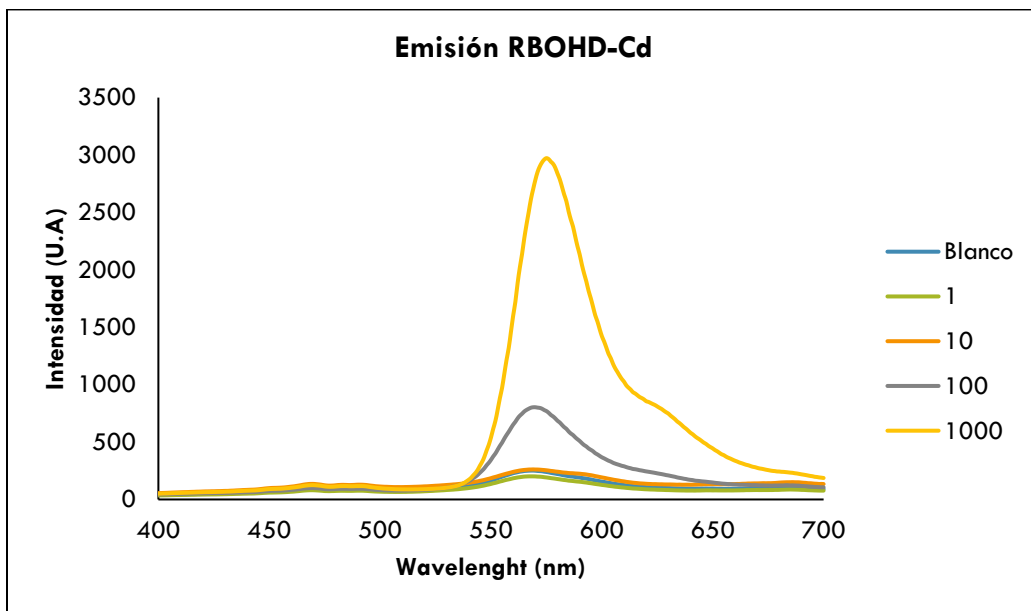
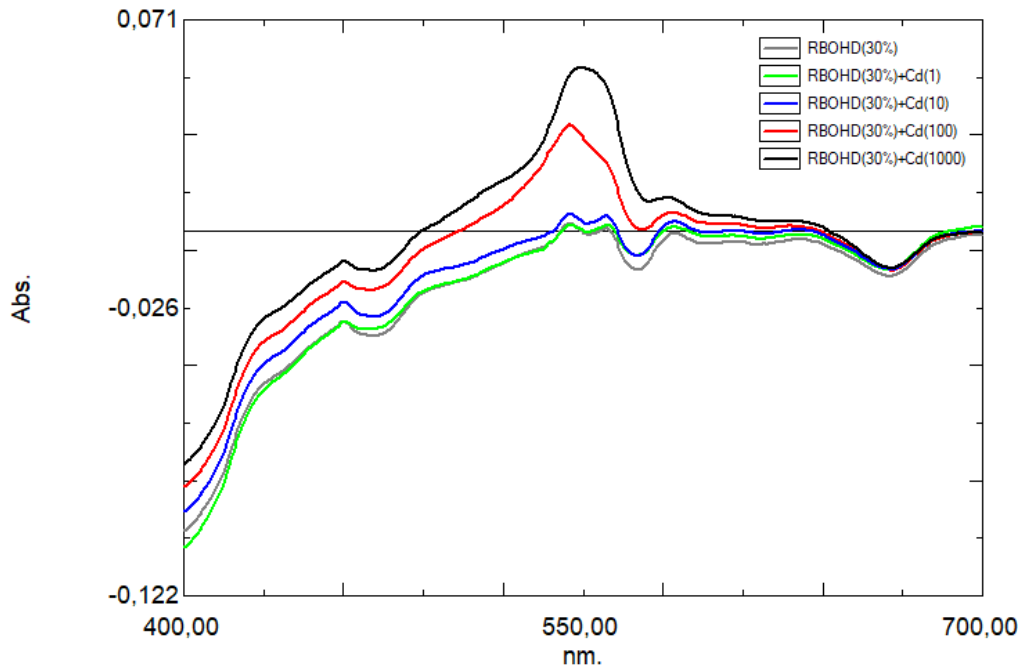
Los resultados de absorbancia, emisión y excitación de la RBOHD con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l) se muestran en la **Tabla 24** y las gráficas obtenidas para cada espectro se muestran en la **Figura 44**.

Tabla 24. Resultados de absorbancia, Emisión y Excitación para RBOHD (70-30%) con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l).

	Absorbancia		Emisión		Excitación	
	Wavelength (nm)	Abs (U.A)	Wavelength (nm)	Em (U.A)	Wavelength (nm)	Exc (U.A)
Blanco	545	0,003	569	251,645	540	1338,154
1	545	0,002	568	201,285	541	1117,509
10	545	0,006	569	261,805	541	1375,518
100	545	0,036	570	803,098	543	4744,069
1000	549,5	0,055	575	2972,46	550	17227,691

Los resultados obtenidos indican que a concentraciones de 10 a 1000µg/l de Cd los valores de intensidad para cada espectro están por encima del blanco, aunque, las mejores intensidades se obtienen entre 100 y 1000µg/l. Para una concentración de 1µg/l la intensidad se encuentra por debajo del blanco y la concentración de 10 tiene mayor intensidad del blanco, pero los valores son cercanos entre sí. En la **Figura 44** se pueden observar las diferencias de intensidades.

Con respecto a las longitudes de onda, en las medidas de absorbancia los valores se mantienen constante hasta una concentración de 1000µg/l. En las intensidades de emisión y excitación, se observa un crecimiento para las diferentes concentraciones de Cd a diferencia de la concentración de 1µg/l que muestra un valor inferior al blanco.



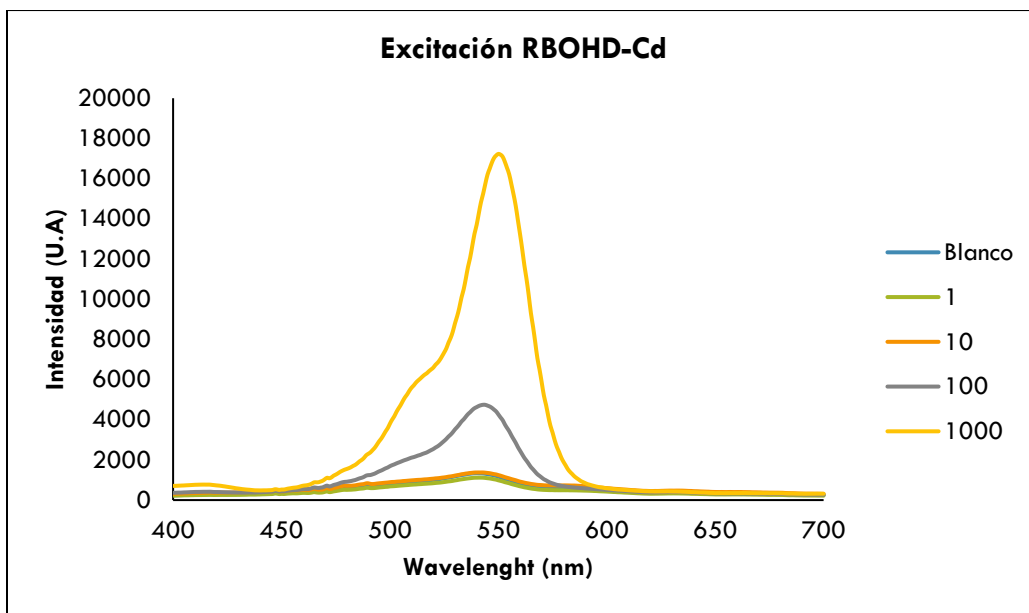


Figura 44. Espectros de absorbanza para RBOHD con diferentes concentraciones de Cd (1-10-100 y 1000µg/l).

Al agregar las diferentes concentraciones de Cd en la solución de RBOHD (70-30%) se observó una leve coloración en la solución con una concentración de 1000 µg/l. Mientras que las soluciones con concentraciones entre 1 y 100 µg/l no mostraron cambios significativos de color en comparación con el blanco. La colorimetría de las diferentes soluciones se muestra en la Figura 45.



Figura 45. Colorimetría de la solución RBOHD (70-30%) a pH 3.75 con concentraciones de Cd a 1-10-100-1000µg/l.

Diferentes reportes indican la influencia del pH en la intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, se procede a medir el pH de la solución (RBOH) sin la DETA teniendo en cuenta que la molécula DETA es altamente reactiva con ácidos fuertes como el ácido sulfúrico el cuál es empleado para reducir el pH. Después se preparan soluciones de RBOH a pH entre 2-10 y se toman mediciones de absorbanza, emisión y excitación de fluorescencia para identificar el pH de mayor intensidad.

5.4.4.2 Selección de pH para RBOHD a radios de volumen 70-30%

La medida de pH para la RBOH indicó un valor de 3,75. En la preparación de las soluciones se observaron diferentes tonalidades color rosa con diferentes intensidades como se muestra en la **Figura 46**.

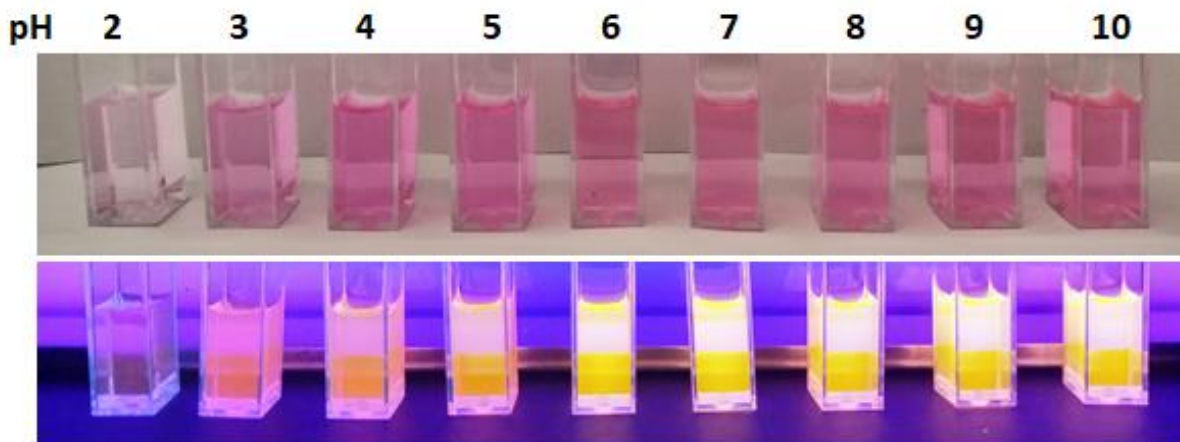


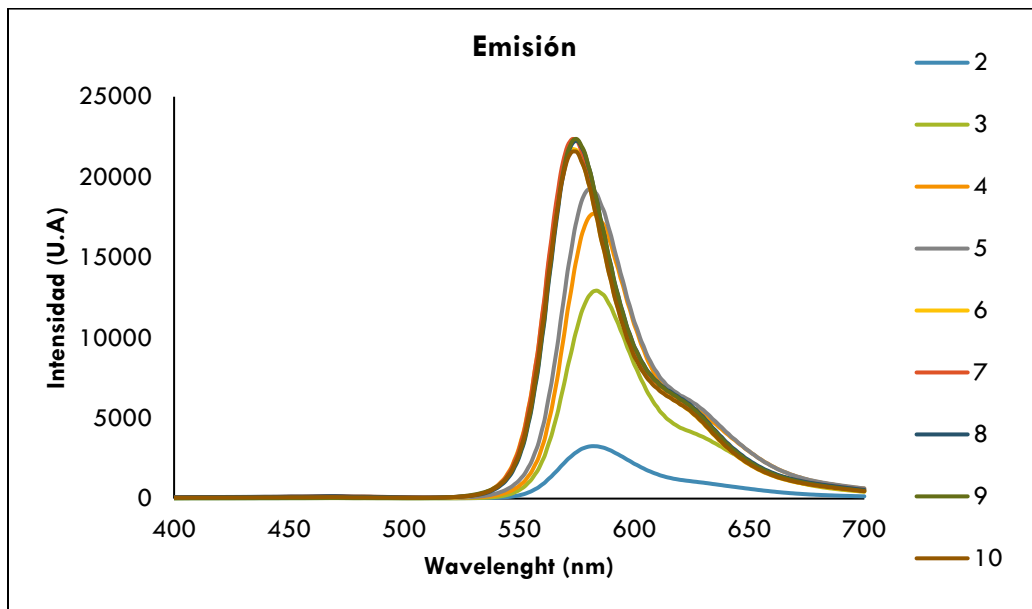
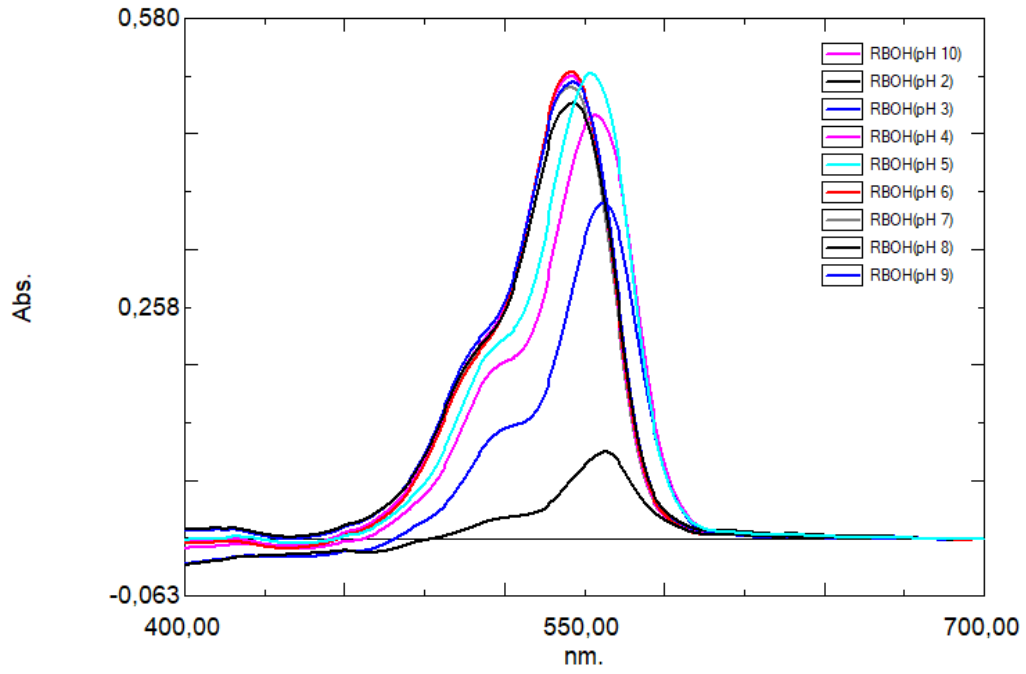
Figura 46. Colorimetría de RBOH a diferentes valores de pH.

Para seleccionar el pH con mayor intensidad se midieron espectros de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 25** y los espectros se muestran en la **Figura 47**.

Tabla 25. Resultados de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia para RBOH a diferentes valores de pH

pH	Wavelength (nm)	Abs (U.A)	Wavelength (nm)	Emisión (U.A)	Wavelength (nm)	Excitación (U.A)
2	558	0,097	582	3262,617	557	18530,791
3	557	0,374	584	12931,216	559	54632,992
4	554	0,472	583	17718,975	563	299805,572
5	552,5	0,518	581	19264,997	562	318331,143
6	545	0,520	573	21743,063	553	362772,426
7	544,5	0,503	574	22360,491	554	373576,509
8	545,5	0,485	575	22274,176	555	78102,523
9	545,5	0,509	575	22267,502	556	76905,883
10	545	0,516	575	21598,191	555	76814,508

Los resultados obtenidos muestran que la mayor absorbancia se tiene a un pH de 6.0. La mayor emisión y excitación se observa para un pH 7. Los valores de absorbancia aumentan para pH entre 2-6, en 7-8 disminuyen y en 9-10 vuelven a aumentar. Los valores de emisión y excitación aumentan de 2 a 7 y luego disminuyen. Con respecto a las longitudes de onda se observan corrimientos entre 1 a 6 nm aproximadamente.



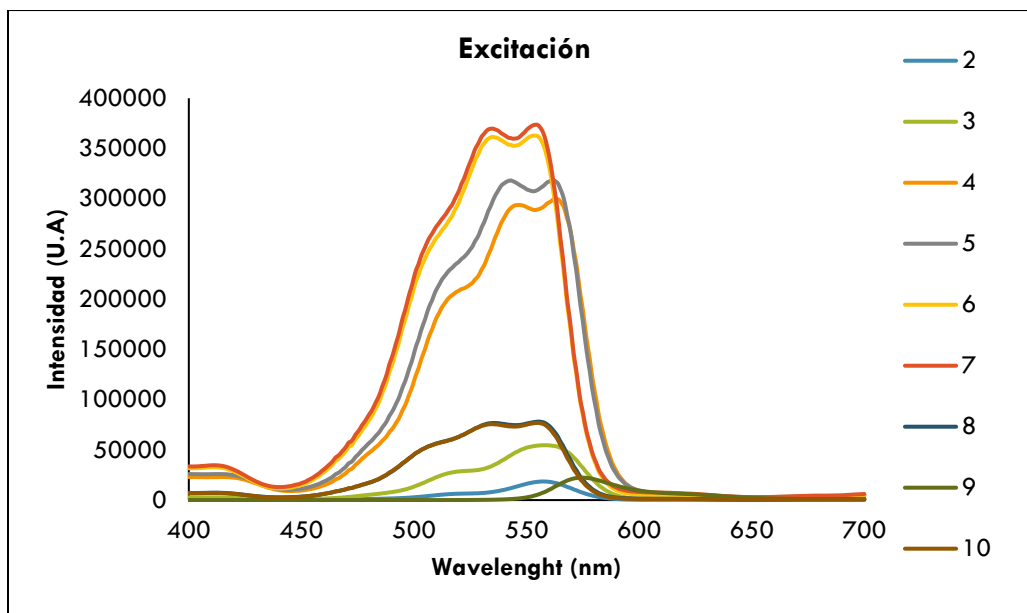


Figura 47. Espectros de absorbanza, emisión y excitación para RBOH a valores de pH entre 2-10.

Para la siguiente evaluación se selecciona un pH de 7.0 debido a que presenta una alta intensidad de emisión y excitación. Además, diferentes reportes académicos han reportado sensores fluorescentes de rodamina con valores de pH comprendidos entre 7 a 7.5 para la detección de diferentes elementos.^{170,175}

5.4.4.3 RBOHD (70-30%) -pH (7.0)

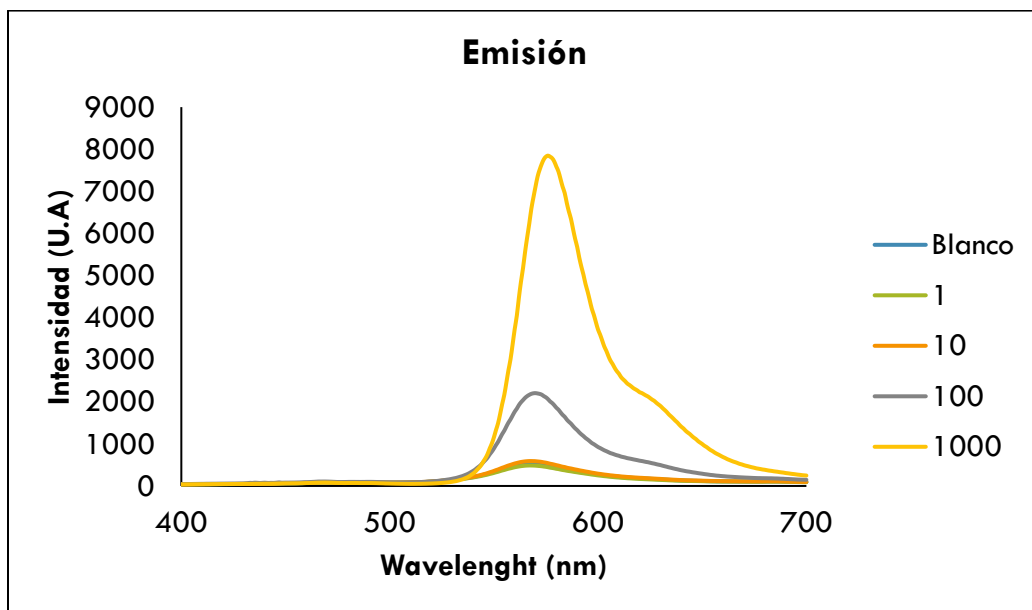
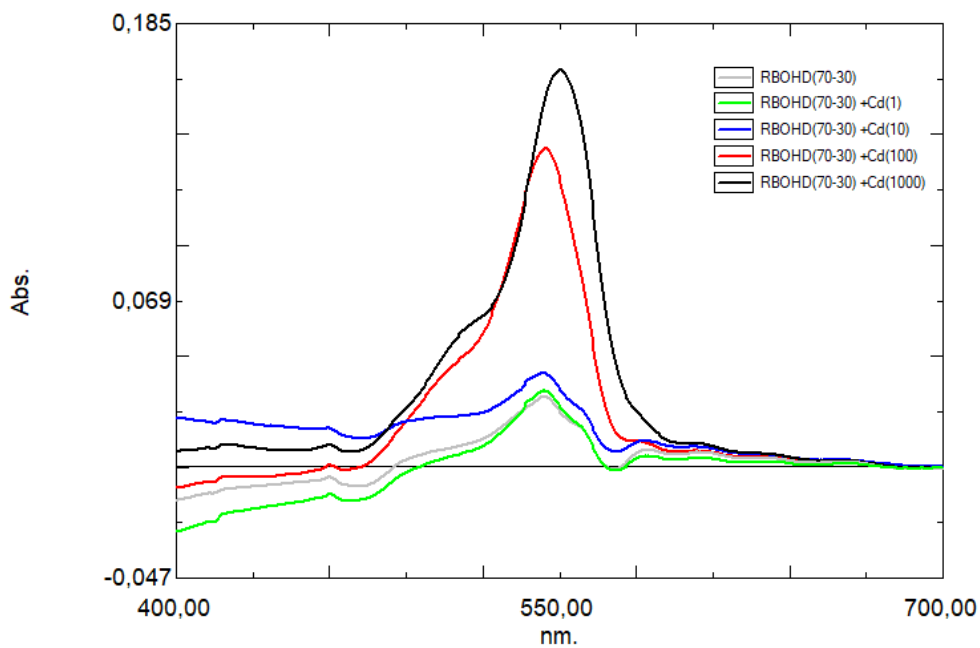
Después de identificar el pH se prepara nuevamente la solución de RBOH con DETA a ratios de volumen 70-30% con el objetivo de identificar cambios significativos en la fluorescencia y colorimetría de la solución. Los resultados obtenidos en absorbanza, emisión y excitación de fluorescencia se muestran en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Resultados de absorbanza, emisión y excitación de fluorescencia de RBOHD (79-30%) con pH 7.0 y concentraciones de Cd de 1-1000µg/l.

Solución	concentración Cd (µg/l)	Wavelength (nm)	Abs (U.A)	Wavelength (nm)	Emisión (U.A)	Wavelength (nm)	Excitación (U.A)
RBOHD	Blanco	544	0,029	568	548,931	539	2825,801
	1	544	0,032	568	486,248667	539	2402,69733
	10	544	0,039	568	591,167333	539	6473,39167
	100	544,5	0,133	570	2204,85233	543	22021,4287
	1000	550	0,166	576	7846,87767	550	90870,3663

De los resultados obtenidos se observa que para concentraciones de 10-1000µg/l de Cd los valores de emisión y excitación se encuentran por encima de los valores del Blanco. A diferencia de la solución RBOHD (70-30%) con pH 3.75 las intensidades de fluorescencia a un pH de 7.0 son más altas.

Con respecto a los espectros para ambos valores de pH no se observa diferencia. Como se muestra en la **Figura 48** se observa que los mayores picos de intensidad se observan a concentraciones de 100 y 1000 $\mu\text{g/l}$.



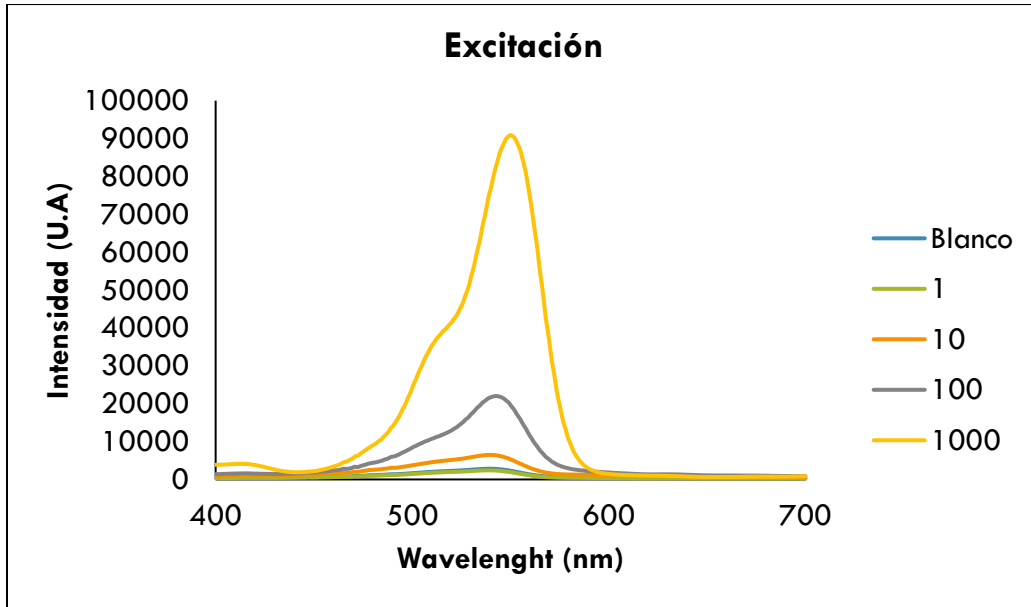


Figura 48. Espectros de emisión y excitación de fluorescencia de RBOHD (70-30%) con pH 7.0 y concentraciones de Cd entre 1-1000µg/l.

Para un pH de 7.0 también se observó un cambio en la colorimetría de las concentraciones de 10 a 1000 µg/l de Cd, como se muestra en la **Figura 49** para mediciones *in situ* en plantas acumuladoras de Cd el cambio de colorimetría es un parametro relevante porque indica presencia del elemento a concentraciones mayores de 10µg/l. Además el resultado se complementa con la mediciones de absorbancia y emisión las cuales indican valores por encima del blanco a concentraciones mayores de 10µg/l.

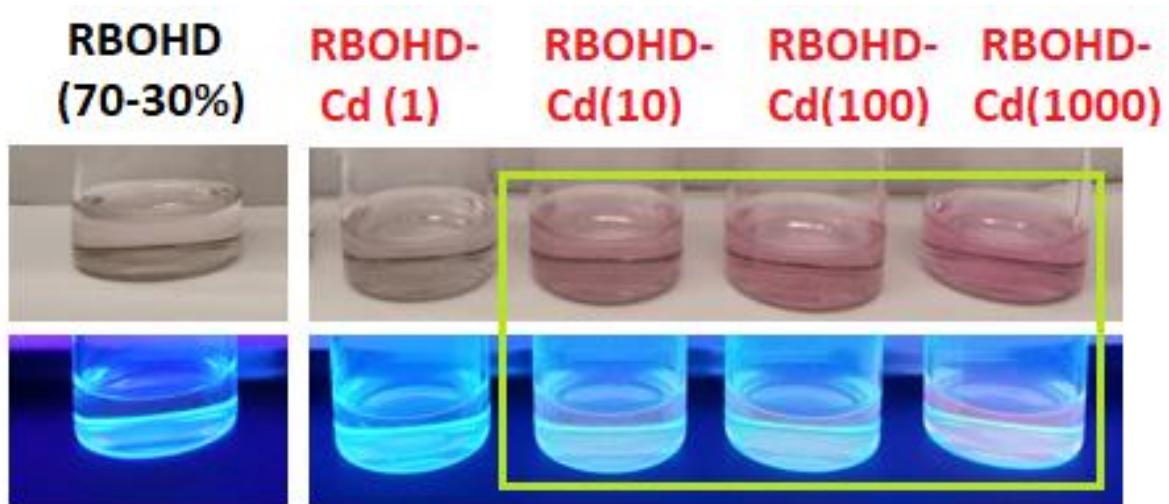


Figura 49. Colorimetría de la solución RBOHD (70-30%) a pH 7.0 con concentraciones de Cd a 1-10-100-1000µg/l.

5.4.4.4 Selectividad

Después de los resultados obtenidos con la solución RBOHD(70-30%) a pH de 7.0 se procedió a evaluar selectividad con los siguientes metales: Zn, Hg, Pb y Cu. Teniendo en cuenta que en la solución, las intensidades más representativas se obtuvieron a concentraciones de Cd de 100 y 1000, se tomaron los espectros de emisión para cada elemento en estas concentraciones y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 50**.

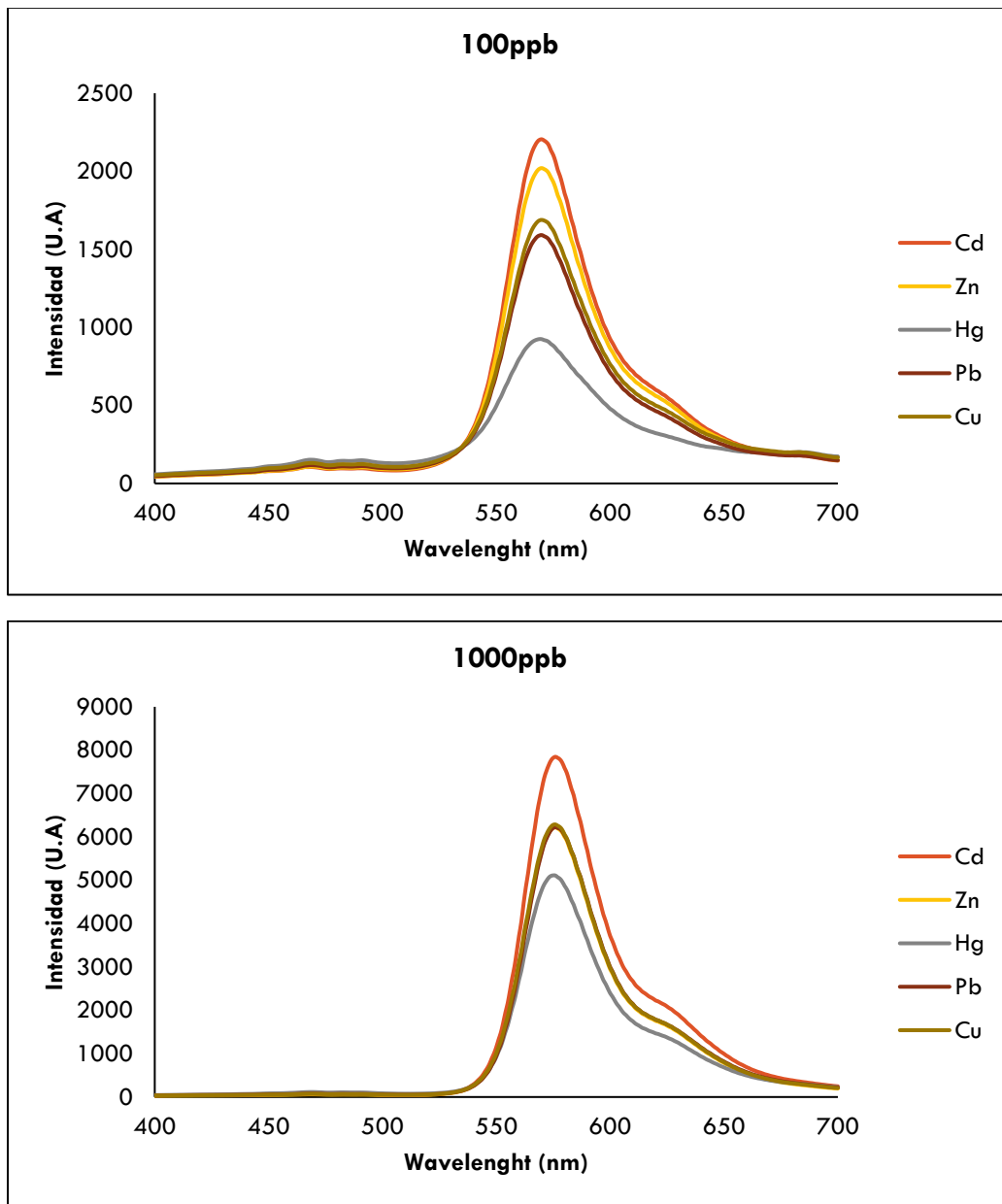


Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia para RBOHD (70-30%) a pH 7.0 con diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb, Cu) a concentraciones de 100 y 1000µg/l.

También se evaluaron las respuestas de fluorescencia de la RBOHD(70-30%) a pH de 7.0 con los diferentes metales. Para la el cálculo se tomaron las longitudes de onda de 568 nm correspondiente al blanco con una intensidad de 548,931 U.A y 576 nm correspondiente a la longitud de mayor corrimiento del Cd. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 27** y se grafican en la **Figura 51**.

Tabla 27. Valores de respuestas de fluorescencia de la RBOHD (70-30%) a pH de 7.0 con los diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb y Cu).

	100	I576nm/I568nm	1000	I576nm/I568nm
Cd	2061,6	3,8	7846,9	14,3
Zn	1893,3	3,4	6218,3	11,3
Hg	867,5	1,6	5107,7	9,3
Pb	1490,9	2,7	6225,7	11,3
Cu	1590,0	2,9	6285,0	11,4

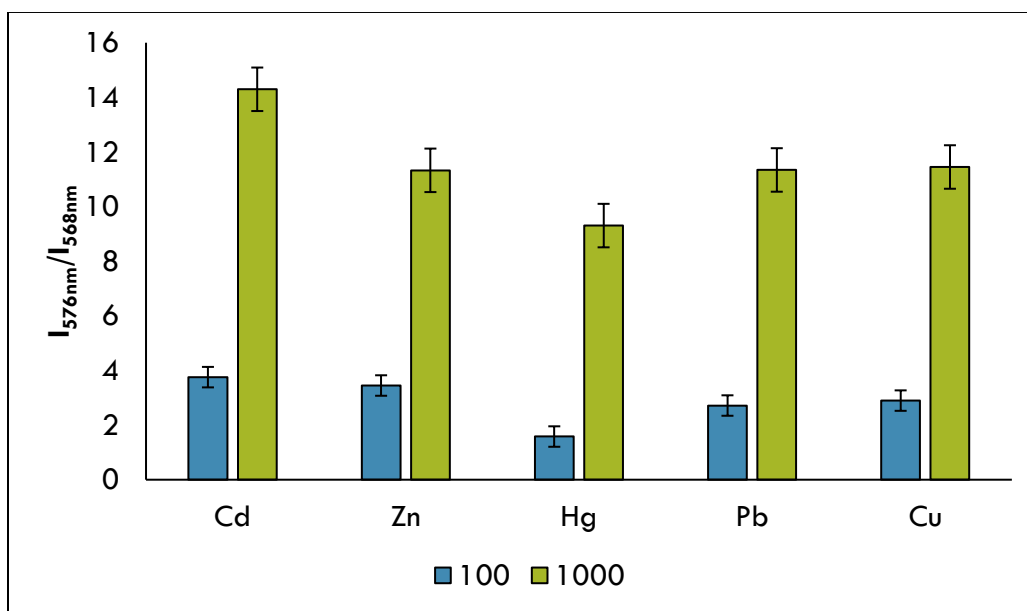


Figura 51. Diagrama de barras de respuestas de fluorescencia (I576nm/I568nm) de la RBOHD (70-30%) a pH de 7.0 con los diferentes metales (Cd, Zn, Hg, Pb y Cu).

En las graficas de los espectros se observa que el pico de mayor intensidad para cada concentración (100 y 1000µg/l) es el del Cd indicando selectividad para este elemento en comparación de los otros elementos. Y el resultado se complementa con los valores de respuesta de fluorescencia para cada elemento como se indica en la tabla 26. Para una concentración de 100 el Cd tiene el mayor valor (3.8 U. A) seguido del Zn (3.4 U.A) el cual es un fuerte competidor del Cd por la semejanza de algunas propiedades químicas. Pero en la concentración de 1000 la distancia de los valores es más notoria para el Cd(14.3U.A) y Zn(11.3U.A).

El Hg a diferencia del Zn obtuvo los resultados más bajos para cada concentración a pesar de pertenecer al mismo grupo en la tabla periódica. Con respecto a los elementos del Pb y Cu los valores se encontraron por debajo del Cd para cada concentración.

Los resultados obtenidos para cada elemento indican que la solución de RBOHD(70-30%) a un pH de 7.0 es selectiva con el Cd. Por lo tanto se da cumplimiento al segundo objetivo del trabajo el cual hace referencia al desarrollo de una configuración radiométrica fluorescente tipo OFF-ON para detección específica de Cd. Con esta configuración se procede a validar la detección *In situ* en plantas de albahaca.

5.4.4.5 Configuración radiométrica fluorescente tipo OFF-ON de RBOHD para detección de Cd²⁺

La interacción de la Rodamina B con la molécula DETA se puede explicar a partir de la interacción del grupo carboxilo (COOH) con el grupo amino (NH₂) de la molécula DETA formando un enlace peptídico que implica la pérdida de una molécula de agua. El oxígeno que compone la molécula de agua se puede unir a átomos de hidrógeno teniendo en cuenta la polaridad de cada átomo. La formación del enlace peptídico genera un aumento de temperatura como resultado de la reacción química que da lugar a la nueva configuración molecular.

Durante la formación del enlace peptídico el grupo amino (NH₂) de la molécula DETA sirve como donante para producir “quenching” o desactivación de la fluorescencia de la rodamina B, produciendo un fenómeno de PET-OFF. Según lo reportado por Borsari et.al¹⁰⁹ el quenching se atribuye a la formación de complejos de transferencia de carga entre un fluoroforo rico en electrones y una molécula con deficiencia de electrones tal como ocurre con la rodamina B y la molécula DETA. La rodamina B tiene 18 electrones no enlazantes de acuerdo con la estructura de Lewis mientras que la DETA tiene 6 electrones libres como se muestra en la **Figura 52**.

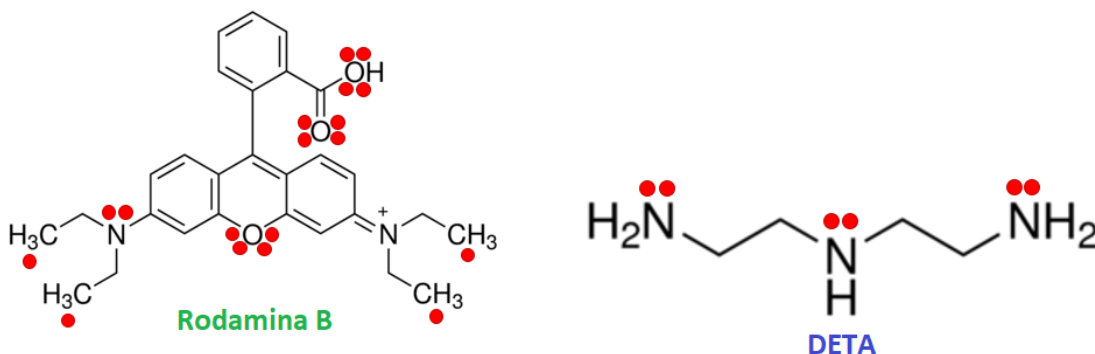


Figura 52. Electrones libres de la Rodamina B y la molécula DETA.

Cuando el Cd²⁺ ingresa a la solución RBOHD puede unirse mediante un enlace covalente coordinado al N que conforma los grupos aminos de la molécula DETA. Cuando el catión Cd²⁺ se une a la molécula se activa la fluorescencia del fluoroforo y el sensor pasa a un estado ON donde el color de excitación depende del fluoroforo y de la longitud de onda de excitación (543-550nm). El proceso se muestra en la **Figura 53**.

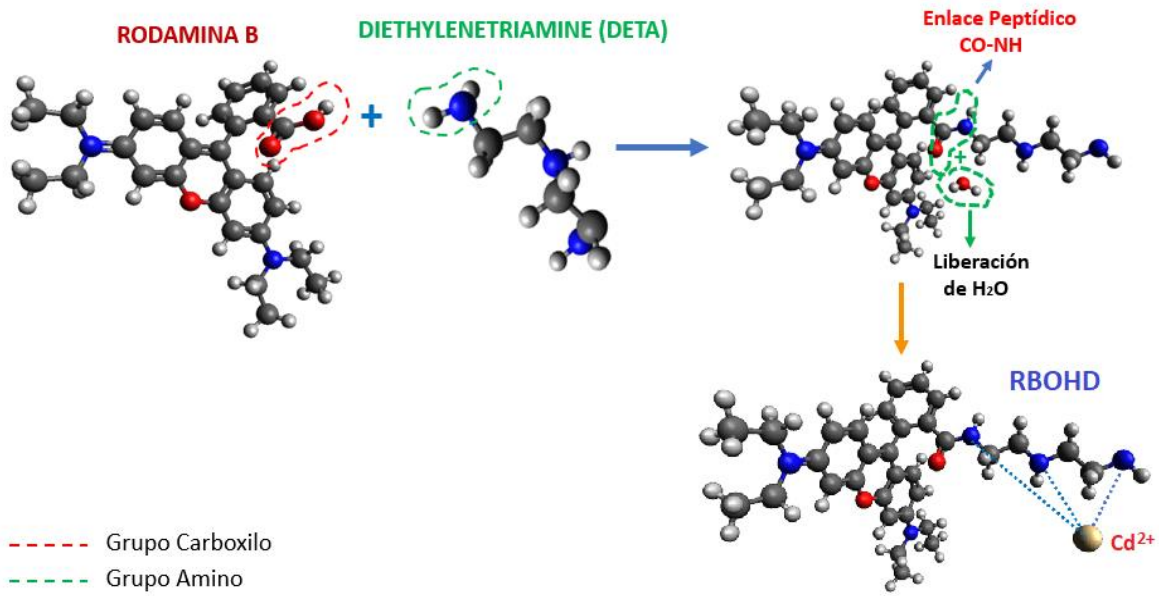


Figura 53. Configuración radiométrica fluorescente tipo OFF-ON de RBOHD para detección de Cd²⁺.

Para la detección del Cd se han reportado diferentes configuraciones empleando diferentes fluoróforos, moléculas y síntesis. Uno de los aspectos a tener en cuenta para la selección de los fluoróforos y la molécula fue la química de coordinación del Cd debido a la importancia de identificar los grupos funcionales de mayor afinidad para garantizar selectividad en comparación a otros elementos.

Para el Cd se han identificado arquitecturas poliméricas 1D, 2D y 3D, y por medio de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se han identificado diferentes estructuras de coordinación entre el Cd²⁺ con diferentes ligandos tales como ligandos de oxígeno (Cd²⁺-O- donador), ligandos de azufre (Cd²⁺-S- donador), ligandos de nitrógeno (Cd²⁺-N- donador) y complejos multinucleares. Para cada ligando se han reportado diferentes constantes de estabilidad (k) de las cuales se observa mayor afinidad del Cd²⁺ a átomos de azufre con valores de k entre 1.2 a 5.4, generando enlaces más fuertes, alta afinidad del Cd²⁺ por grupos nitrogenados especialmente cuando decrece el número de coordinación y los valores de K se encuentran en un rango de 1.36 hasta 10.75, mientras que para átomos de oxígeno unidos a grupos carbonilos se resalta una interacción mucho más débil con constantes que varían entre 0 a 1.8.¹⁰⁹

La configuración de RBOHD (70-30%) permite una detección *In situ* del Cd. Además, el pH es un parámetro de gran importancia porque permite mejorar la intensidad de fluorescencia de la solución en presencia del Cd. Teniendo en cuenta que el objetivo del trabajo es la detección *In situ* del Cd en plantas de albahaca y la solución de RBOHD (70-30%) permite la medición de fluorescencia para concentraciones de Cd mayores a 10 µg/l se selecciona esta solución para validar la detección. Además, es importante resaltar que en el estudio de acumulación de Cd en las plantas de albahaca se encontró que en un periodo de 7 días la planta registra concentraciones mayores de 30 µg/l a exposiciones de Cd de 10 µg/l. En condiciones de cultivo normales para esta especie se pronostican valores que superan los 100 µg/l e incluso los 1000 µg/l si durante el tiempo de cultivo la planta fue regada con agua contaminada a diferentes concentraciones de Cd.

6 DETECCIÓN *IN SITU* DE Cd EN PLANTAS DE ALBAHACA

6.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sensores moleculares con una configuración radiométrica fluorescente es de gran importancia para tareas de detección *In situ* de metales pesados en plantas de consumo humano. Muchos de los sensores reportados para detección de Cd²⁺ se han desarrollado en soluciones acuosas¹⁶⁵ teniendo en cuenta que la contaminación por metales pesados tales como Hg, As, Cd y Pb entre otros en agua para consumo humano ha generado serios problemas de salud en diferentes lugares del mundo.

El agua contaminada también es empleada para usos de riego en cultivos de hortalizas u otras especies de consumo humano, generando problemas de bioacumulación tanto en suelo como en los diferentes alimentos. Duan et.al¹⁶⁶ resaltan el uso los sensores moleculares porque son altamente selectivos, simples y económicos, sin embargo la aplicación de los sensores para detección de metales pesados en plantas es un tema vigente de estudio con pocos reportes hasta la fecha y con amplia proyección para los próximos años.^{167,168}

En el presente año, en Wang et al.¹⁶⁹ se reporta un sensor fluorescente colorimétrico basado en emisión inducida por agregación (AIE) mediante el uso de nanoclusters de oro estabilizados con diferentes reactivos. Para la detección *In situ* se emplearon tiras de papel fluorescente integradas con la plataforma de un teléfono inteligente para detección de Cd²⁺ en muestras de arroz compradas en supermercados. Las muestras de arroz empleadas en este experimento fueron sometidas a diferentes concentraciones de Cd dentro del laboratorio para evaluar los cambios de colorimetría en las soluciones dadas.

Aunque el trabajo que propone Wang se enfoca en la detección de cationes de Cd²⁺ en granos de arroz, no se realizan acciones de detección *In situ* en la planta ni en el producto final derivado de la misma. Las plantas de arroz bioacumulan Cd²⁺ pero han sido reportadas preferencialmente como hiperacumuladoras de As, En países como Australia, el estudio de bioacumulación por arsénico ha despertado gran interés por ser el arroz uno de los productos de mayor consumo y exportación. Además, el arsénico presenta diferentes estados de oxidación y posee la capacidad de cambiar de un estado a otro, lo que representa un serio problema para la salud humana.^{34,181,182}

En el presente capítulo se configura un método pionero para detección *In situ* de Cd²⁺ en plantas de consumo humano, específicamente albahaca. Inicialmente se realiza un estudio previo que resalta la importancia de comprender la fenomenología presente en los procesos de bioacumulación de metales pesados en plantas de consumo humano. Esto permite proporcionar nuevos elementos de utilidad para abordar el problema de bioacumulación de metales pesados en plantas. También se hace caracterización por microscopía óptica y electrónica de las raíces de las plantas de albahaca, y se procede a detección *In situ* de Cd^{en} las raíces de plantas de albahaca que fueron expuestas a este metal empleando la configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) obtenida y caracterizada en el segundo capítulo. Finalmente, se determina el rendimiento cuántico de la configuración radiométrica, así como su sensibilidad y especificidad del Cd en el protocolo de detección.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Materiales

Siguiendo el método indicado en el capítulo 1, para el montaje se emplearon plántulas de albahaca con un tiempo de vida de 4 semanas de siembra, las cuales fueron obtenidas del Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Las plántulas se sembraron en agua contenida en viales de vidrio con capacidad de 20ml. Se abonaron con fertilizante líquido “crecilizer” con una composición de Nitrógeno total: 200g/l; fosforo asimilable (P_2O_5); 100g/l y potasio soluble en agua (K_2O):100g/l. Las plántulas fueron estabilizadas con espuma industrial y se expusieron a 50 μ g/l de Cd. Para la siembra se empleó el método de raíz flotante reportado por Liu.⁸⁹

Los reactivos empleados en el estudio experimental de sensado molecular fueron los siguientes: Rodamina B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$) para fluorescencia y Diethylenetriamine (DETA)-ReagentPlus 99%, los cuáles fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Cd standard for IC, 1000 mg/L en agua es proporcionado por nanoCiTec. Como solvente se usa Etanol-alcohol étílico absoluto para análisis EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur obtenido en Merck. as soluciones se preparan en viales de vidrio de 10ml y 20ml respectivamente.

La limpieza de los viales se realizó con agua milli-Q haciendo uso de ultrasonido a una temperatura de 50°C durante 30 min y secado en horno industrial a temperatura de 80°C durante 24h.

6.2.2 Detección del lugar de actuación del Cd en raíces de albahaca

El diseño experimental propuesto fue de bloques al azar con tres repeticiones. Para el experimento se emplearon raíces secas de plántulas de albahaca (RS), raíces frescas de plántulas de albahaca (RF) y raíces de plántulas de albahaca (RP). Las raíces secas fueron extraídas cuidadosamente de las plántulas y se secaron en horno a una temperatura de 80°C en un tiempo de 72h. Después del secado, las diferentes raíces (RS, RF, RP) son expuestas a una concentración de Cd de 50 μ g/l en viales de 20ml durante 2 periodos de tiempo correspondientes a 24h y 8días.

Por bloque se emplearon 9 raíces de cada categoría (RS, RF y RP) las cuales fueron distribuidas como se muestra en la **Figura 54**. El primer análisis se realizó 24h después de la exposición y el segundo análisis se realiza 8 días después de la exposición. Para cada análisis se seleccionaron al azar 3 raíces por bloque, las cuales fueron extraídas cuidadosamente y lavadas con abundante agua desionizada. Posteriormente se realizaron procesos de secado a 80°C por 72h para posteriormente proceder con morterado, digestión y análisis mediante técnica analítica de ICP de masas. Para la digestión se emplea el protocolo de tejido de planta seca DG-AG-02 con una cantidad de muestra de 0.3g. El análisis se realizó en el laboratorio de aguas de la Pontificia Universidad Javeriana.

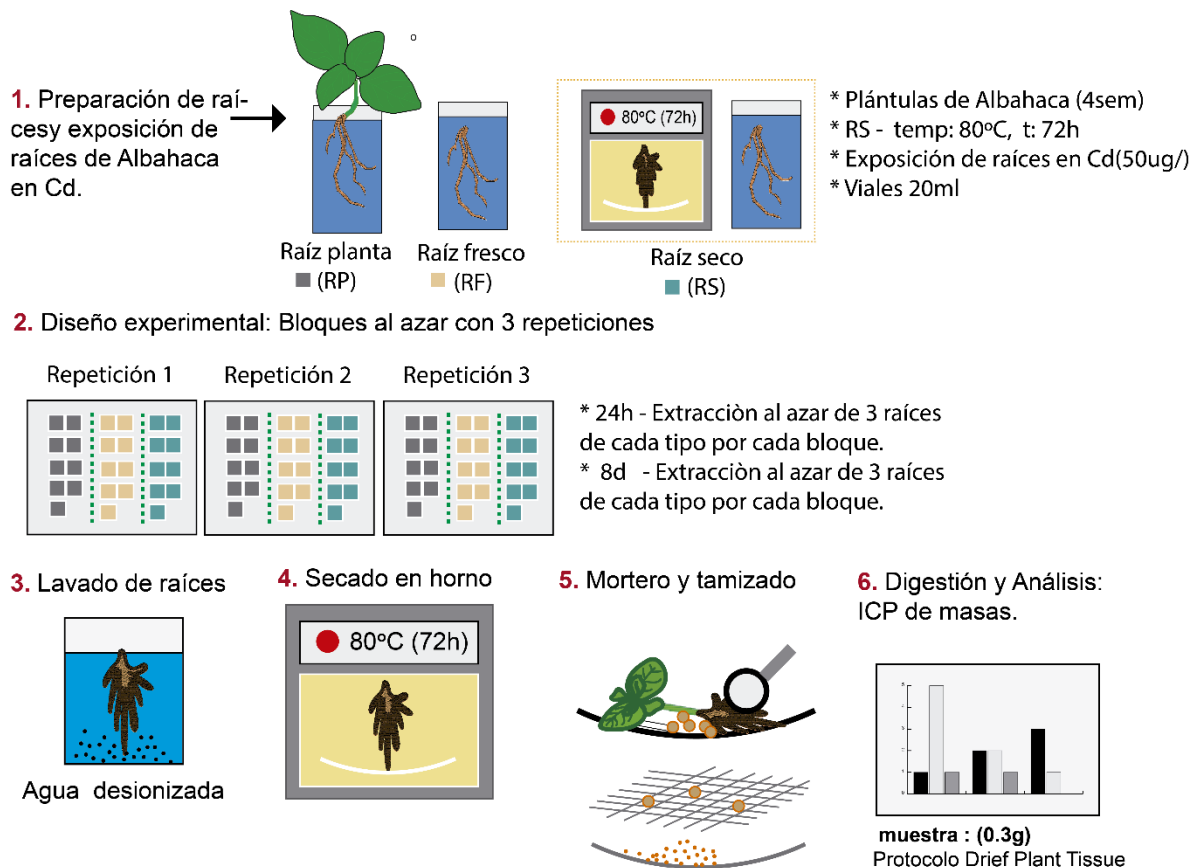


Figura 54. Montaje experimental para detección de absorción o adsorción de Cd²⁺ en raíces de albahaca.

6.2.3 Caracterización de raíces por microscopía óptica y electrónica (SEM).

Para caracterización de microscopía óptica y electrónica se tomaron muestras de raíz de plántulas de albahaca. Para microscopía óptica las muestras se ubicaron en portaobjetos de vidrio y se observaron en un microscopio óptico de referencia Nikon Eclipse E200 a una resolución de 20x.

Para microscopía electrónica SEM La fijación se hizo en glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos 0,1M con pH 7.2 a temperatura ambiente durante un periodo de 5h. Posteriormente se dejó en amortiguador de fosfatos durante 24h. La deshidratación se hizo con alcohol al 96% en aumentos graduales de concentración: 30% a 15min, 50% a 30min, 70% a 30min, 90% a 30min y 100% a 30min. Posteriormente se hizo secado de punto crítico con equipo de referencia SANDRI®-795 en el centro de microscopía de la Universidad de los Andes. La metalización de la muestra y el respectivo análisis por microscopía electrónica se realiza con un Microscopio de Barrido SEM ZEISS HQ 50 del laboratorio de Nanociencia y Nanotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.2.4 Detección de Cd^{2+} de raíces de albahaca con configuración radiométrica fluorescente RBOHD

Se propuso un diseño experimental de un bloque con tres repeticiones como se muestra en la **Figura 55**. Para el experimento se emplearon plántulas de albahaca, las cuales fueron expuestas a una concentración de Cd de $50\mu\text{g/l}$ en viales de vidrio de 20ml durante un periodo de 2semanas. Por cada repetición se emplearon 20 plantas expuestas a Cd y 10 plantas control. Transcurridos 3 días (3d) de exposición se seleccionan al azar 3 plantas expuestas a Cd por cada repetición. Las raíces de las plántulas seleccionadas fueron extraídas cuidadosamente y lavadas con agua mili Q para eliminar residuos. Posteriormente se introducen 3 raíces en una solución de 8ml de RBOHD para un total de 3 muestras. Cada solución se sonicó por un tiempo de 20 min. Después se tomaron medidas de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia y se realizaron cálculos respectivos de rendimiento cuántico de fluorescencia. El procedimiento se repitió para plántulas con un tiempo de exposición de 2 semanas y con plántulas control.

La caracterización de la configuración radiométrica fluorescente RBOHD(70-30%) se caracterizó mediante espectros de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia. Los espectros de absorbancia UV-VIS fueron tomados con el Espectrofotómetro - UV-2600 – Shimadzu UV/Visible. Los espectros de emisión y excitación de fluorescencia son tomados con el Espectrómetro de fluorescencia -RF 6000- Shimadzu. Los espectros se tomaron en un rango de 400-700nm teniendo en cuenta los rangos de medición establecidos en el capítulo 2.

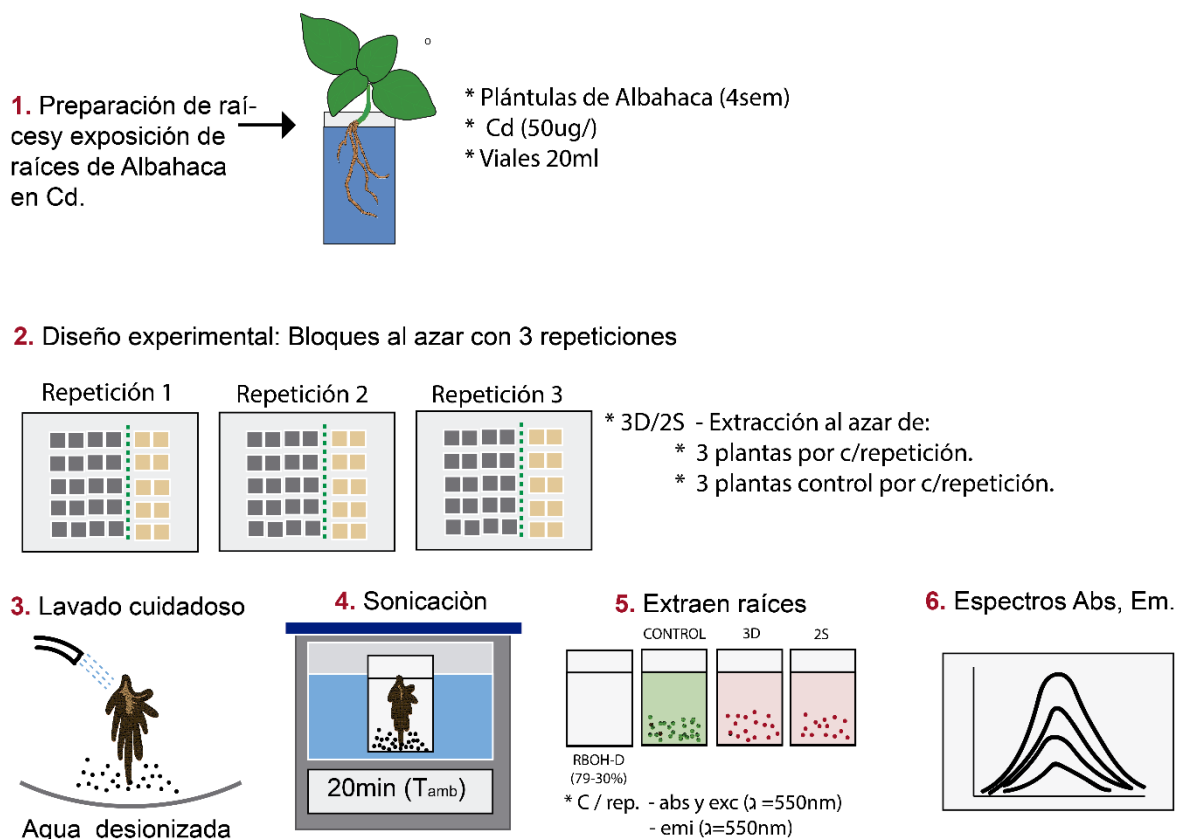


Figura 55. Montaje experimental para detección de Cd^{2+} en raíces de albahaca en configuración radiométrica fluorescente RBOHD.

6.2.1 Rendimiento cuántico

La eficiencia de la fluorescencia se define como rendimiento cuántico (φ), el cual hace referencia a la relación de fotones emitidos por la molécula fluorescente con respecto a fotones absorbidos. El rendimiento cuántico se obtiene mediante la ecuación (4) ¹⁸⁰ :

$$\varphi_m = \varphi_r * \left[\frac{I_{f_m}}{I_{f_r}} \right] * \left[\frac{A_r}{A_m} \right] * \left[\frac{n_m}{n_r} \right]^2 \quad (4)$$

Donde φ_m corresponde al rendimiento cuántico de la muestra a medir, φ_r es el rendimiento cuántico de referencia, I_{f_m} es el área bajo la curva del espectro de emisión de la muestra, I_{f_r} es el área bajo la curva del espectro de emisión de la referencia, A_r es la absorbancia o fracción de luz absorbida por la referencia, A_m es la absorbancia o fracción de luz absorbida por la muestra correspondiente a la longitud de onda de excitación de la configuración fluorescente para detección de Cd (550nm), n_m es el índice de refracción de la muestra y n_r es el índice de refracción de la referencia.

El área bajo la curva del espectro de emisión se determina con la fórmula de integración de integración Newton-cotes de la regla de Simpson 1/3 de aplicación múltiple. El área se determina con la ecuación (5).

$$I = (b - a) * \frac{f(x_0) + 4 \sum_{i=1,3,5}^{n-1} f(x_i) + 2 \sum_{i=2,4,6}^{n-2} f(x_i) + f(x_n)}{3 * n} \quad (5)$$

Los índices de refracción se estiman según lo reportado por Reis et.al 2010. ¹⁸³

6.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

De la vigilancia tecnológica para los últimos 20 años, se logra establecer el estado del arte con respecto a investigación con albahaca. Países como Estados Unidos, India, Irán y Brasil son los más activos en investigación de la albahaca en general. En Colombia se reportan escasos estudios orientados a esta planta tal como se indica en la **Figura 56**.

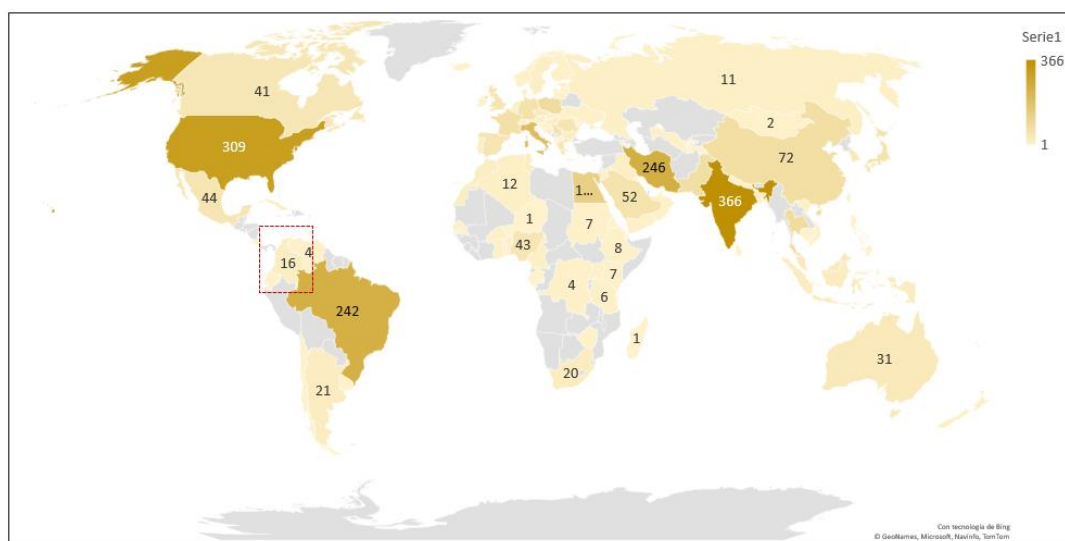


Figura 56. Estudio de Bioacumulación de Cd en Albahaca en diferentes países del mundo.

En la **Figura 57** se indican los estudios reportados sobre albahaca y Cd. Como se puede apreciar, el número de productos de investigación es incipiente a nivel global. En Colombia aún no se reportan estudios en esta dirección, lo que lleva a inferir que este trabajo es uno de los primeros en el país en investigar la fenomenología de bioacumulación y estrategias de detección de Cd en albahaca.

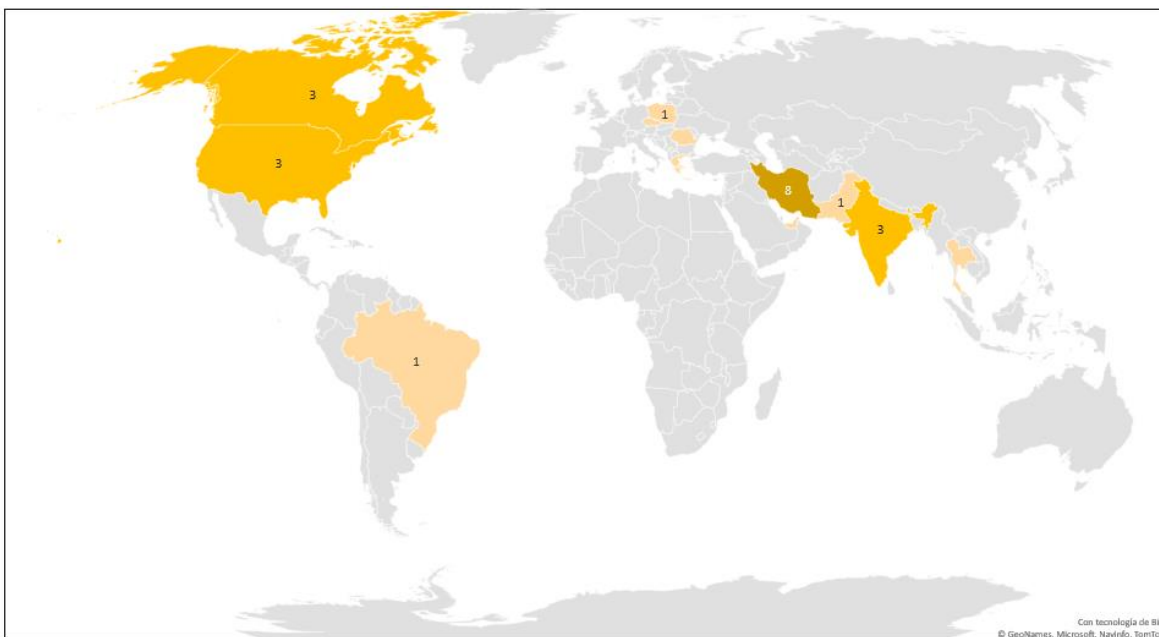


Figura 57. Estudio de detección de Cd en Albahaca en diferentes países del mundo.

6.3.1 Caracterización de fijación del Cd²⁺ en las raíces de albahaca

Los resultados obtenidos para cada tipo de raíz (que ya fueron anteriormente clasificadas) se muestran en la **Tabla 28.** con su respectiva repetición y valor promedio. El diagrama de barras para los resultados promedio se indican en la **Figura 58.**

Tabla 28. Resultados de concentración de Cd para los diferentes tipos de raíz: raíz seca (RS), raíz en fresco (RF) y raíz de la planta (RP).

	unidades	TIPO DE RAÍZ	1	2	3	PROMEDIO	DS
8d	µg/l	FRESCO	66,4	65,1	64,3	65,27	1,06
8d	µg/l	PLANTA	78,3	77,6	76,3	77,40	1,01
8d	µg/l	SECO	61,3	61,8	60,4	61,17	0,71
24H	µg/l	FRESCO	42,6	42,8	42,9	42,77	0,15
24H	µg/l	PLANTA	40,6	40,5	42	41,03	0,84
24H	µg/l	SECO	40,2	40,6	39,8	40,20	0,40

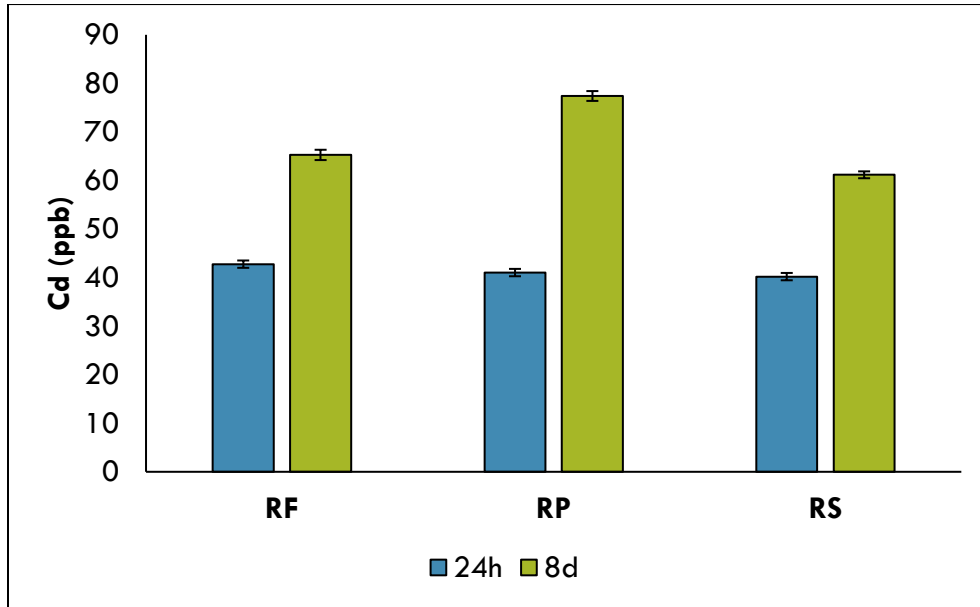


Figura 58. Resultados promedio de concentración de Cd para los diferentes tipos de raíz: raíz seca (RS), raíz en fresco (RF) y raíz de la planta (RP).

Para los resultados obtenidos se hace un análisis Anova de dos factores -día y tipo de raíz- con diferentes muestras y se obtienen las gráficas de residuos que muestra la probabilidad normal y el histograma como se muestra en la Figura 59. Los resultados del análisis de varianza se muestran en la Tabla 29.

También se realiza análisis de comparaciones Tukey con un nivel de confianza del 95% para los diferentes tipos de raíz. El análisis Anova se realizó en Minitab y los resultados obtenidos se muestran a continuación:

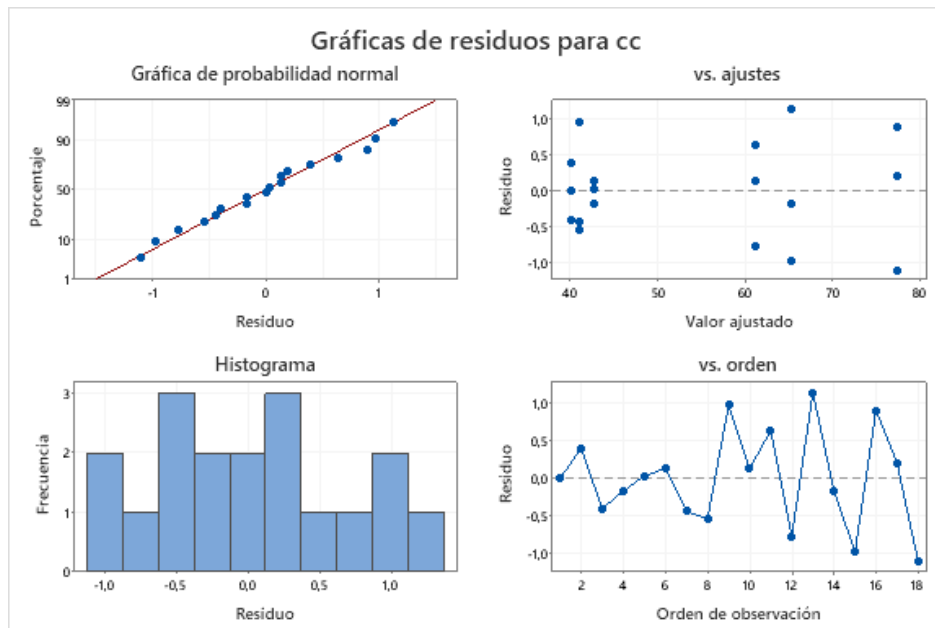


Figura 59. Gráfica de residuos para las concentraciones de Cd en los diferentes tipos de raíz (RS, RF, RP).

Tabla 29. Análisis de varianza de dos factores (Día, tipo de raíz) e interacción entre los dos factores (Día*tipo raíz) con un nivel de confianza del 95%

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	Valor crítico para F
DÍA	1	3186,68	3186,68	5396,07	0,000	4,74723
TIPO RAÍZ	2	221,94	110,97	187,91	0,000	3,88529
DÍA*TIPO RAÍZ	2	215,90	107,95	182,79	0,000	3,88529
Error	12	7,09	0,59			
Total	17	3631,60				

En la gráfica de residuos se puede observar que los datos se distribuyen normalmente teniendo en cuenta la gráfica de probabilidad normal. La Hipótesis nula y la hipótesis alterna que se plantearon para el análisis fueron las siguientes:

H₀: No se observan diferencias entre las medias de concentración de Cd para cada tipo de raíz (RS, RF, RP)

H_a: Al menos un par de medias de concentración de Cd para cada tipo de raíz (RS, RF, RP) es diferente.

Para aceptar o rechazar la hipótesis nula se emplearon los siguientes criterios:

1. Si el valor $F < \text{valor crítico para } F$, entonces se acepta la hipótesis nula, de lo contrario se acepta la alterna. El estadístico F también conocido como estadístico de Fisher se puede emplear para evaluar la igualdad de varianzas, evaluar la significancia general de un modelo de regresión y también se puede emplear para evaluar la igualdad entre las medias para aceptar o rechazar una hipótesis nula.
2. Si el valor de $P < \alpha$ (0,05) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de varianza se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna para cada criterio como se muestra en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Resultados de pruebas de hipótesis del análisis de varianza de dos factores (Día, tipo de raíz) e interacción entre los dos factores (Día*tipo raíz) con un nivel de confianza del 95%.

Factor	Resultado	Condición
Día	valor $F > \text{valor crítico para } F$	Rechaza H ₀
Tipo raíz	valor $F > \text{valor crítico para } F$	Rechaza H ₀
Día*tipo raíz	valor $F > \text{valor crítico para } F$	Rechaza H ₀
Día	$P < \alpha$	Rechaza H ₀
Tipo raíz	$P < \alpha$	Rechaza H ₀
Día*tipo raíz	$P < \alpha$	Rechaza H ₀

Estos resultados indican que las medias de concentración de Cd dependen de cada uno de los factores, es decir, el tiempo de exposición (8D y 24H), los diferentes tipos de raíz y el tiempo de exposición para cada tipo de raíz.

En los promedios de concentración se observan diferencias entre los valores obtenidos a las 24h de exposición a Cd y los valores obtenidos en un periodo de 8 días los cuáles reportan mayor concentración. Por otro lado, también se observan diferencias entre las concentraciones alcanzadas para cada tipo de raíz. Por ejemplo, la raíz de la planta alcanzó una concentración de 77,40 µg/l seguido de la raíz en fresco 65,27 µg/l y finalmente la raíz en seco con un valor de 61.17µg/l.

Los resultados del análisis de comparaciones por Tukey para el tipo de raíz se muestran en la **Tabla 31** y las pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias se muestran en la **Tabla 32** y se grafican en la **Figura 60**.

Tabla 31. Comparaciones por parejas de Tukey: TIPO RAÍZ con un nivel de confianza del 95%

TIPO RAÍZ	N	Media	Agrupación
PLANTA	6	59,2167	A
FRESCO	6	54,0167	B
SECA	6	50,6833	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 32. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TIPO RAÍZ niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
PLANTA - FRESCO	5,200	0,444	(4,017. 6,383)	11,72	0,000
SECA - FRESCO	-3,333	0,444	(-4,516. -2,151)	-7,51	0,000
SECA - PLANTA	-8,533	0,444	(-9,716. -7,351)	-19,23	0,000

Nivel de confianza individual = 97,94%

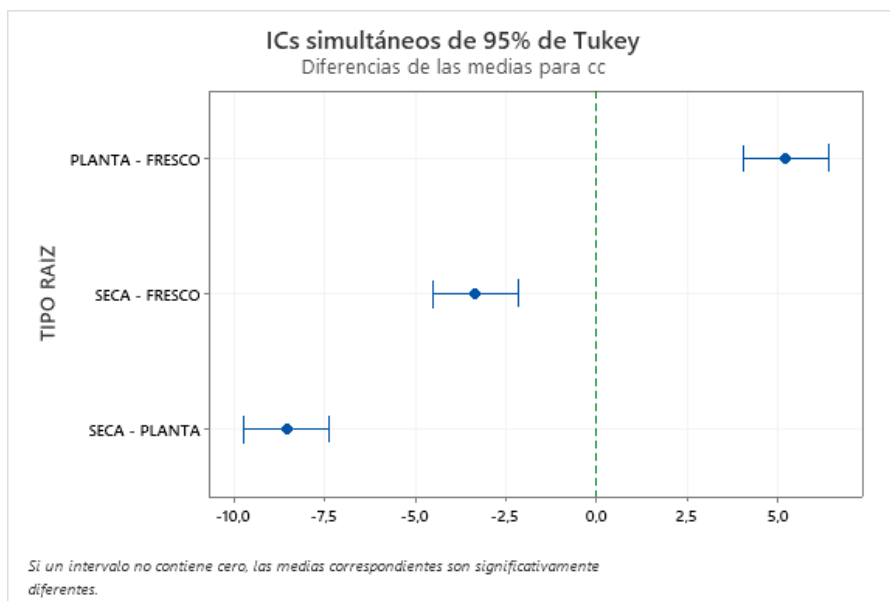


Figura 60. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias.

Los resultados de comparaciones para cada tipo de raíz muestran 3 grupos diferentes (A, B y C) y las pruebas simultáneas para diferencias de las medias por grupo señalan que las medias son significativamente diferentes.

Para las raíces en fresco y las raíces de las plantas completas, se evidencia actividad celular y las concentraciones que se obtienen para un tiempo de 8 días son mayores porque los iones se adhieren a la superficie, pero también internalizan. Este resultado es de gran importancia en la fenomenología de bioacumulación de metales pesados en plantas debido a que las concentraciones que se reportan mediante

métodos tradicionales se reportan como bioacumulación, pero no se tienen en cuenta los iones que se adhieren a la superficie y los que internalizan. Además, es importante resaltar si los daños morfológicos y fisiológicos en la planta se deben a la cantidad de iones que internalizan o se debe a la barrera electrostática que generan los iones metálicos en la superficie de las raíces reduciendo la entrada de iones esenciales para el correcto funcionamiento de la planta. Por otro lado, también se puede considerar que las bajas concentraciones de iones que internalizan producen daños significativos en plantas que no toleran el elemento y es importante realizar estudios moleculares que den cuenta de los daños en función de las concentraciones entre otros.

Este resultado es de gran importancia porque en los reportes académicos siempre se hacen referencia a procesos de absorción y no de adsorción en bioacumulación de metales pesados en plantas. Además, los iones que quedan en superficie pueden ser un factor de gran importancia en tareas de detección. Para la detección *In situ* de Cd en las raíces de albahaca, se recomienda que se realice en la superficie de la raíz.

Caracterización de raíces por microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM).

La albahaca es una planta tipo *dicotiledónea*. Su raíz se caracteriza por tener una ramificación principal de la cual se desprenden otras secundarias. Las raíces tienen pelos radicales que se originan en las células epidérmicas y se encargan de absorber agua y minerales disueltos en las plantas. El tamaño y organización del sistema radicular depende de diferentes factores tales como el ambiente en que se desarrolla la planta, la estructura y compactación del suelo, la disponibilidad de agua y nutrientes, además de formas de vida presentes en el suelo tales como microorganismos, hongos y demás especies microscópicas. Las células de la epidermis forman una barrera impermeable que se encarga de proteger a la planta.

En las imágenes por microscopía óptica se muestra un corte transversal de las raíces de albahaca, en la cual se puede apreciar los pelos radicales y la estructura celular de las raíces con sus diferentes capas. Rizodermis, exodermis, parénquima cortical, endodermis, periciclo y médula entre otras. Las dimensiones de longitud, ancho, alto y relación de aspecto se indican en la **Tabla 33** para un total de 10 muestras. Las imágenes de microscopía óptica se aprecian en la **Figura 61**.

Tabla 33. Dimensiones de algunas capas celulares de raíces de albahaca.

	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Alto (μm)	Relación de aspecto
Médula	7,669	2,447	1,414	0,375
Endodermis	15,703	5,643	2,724	0,436
Exodermis	39,285	12,182	6,791	0,402
Rizodermis	44,555	8,340	13,197	0,133

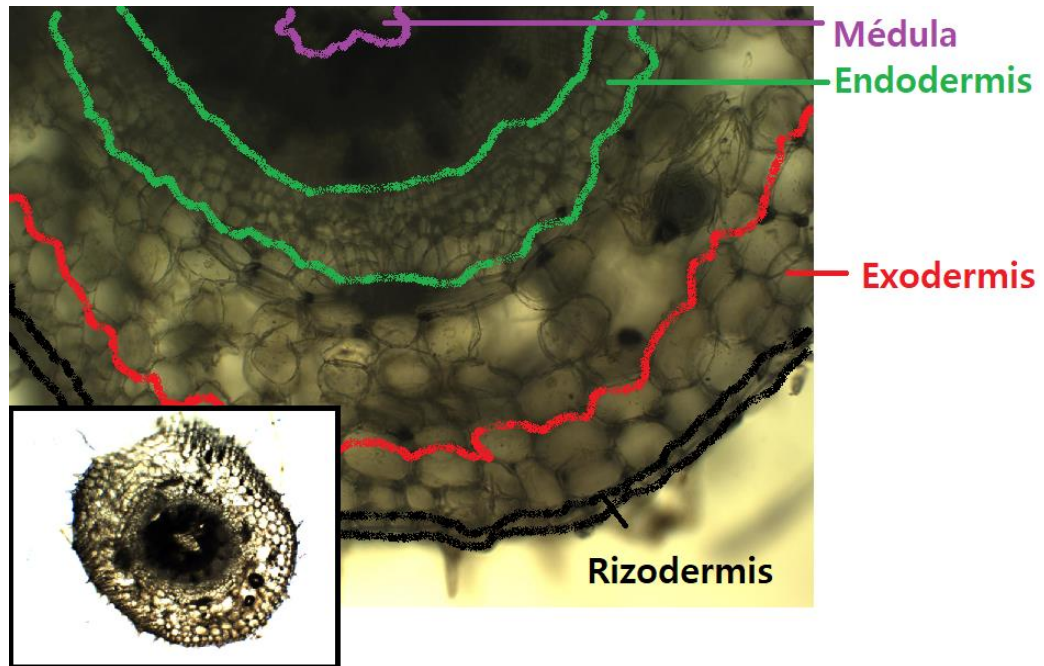
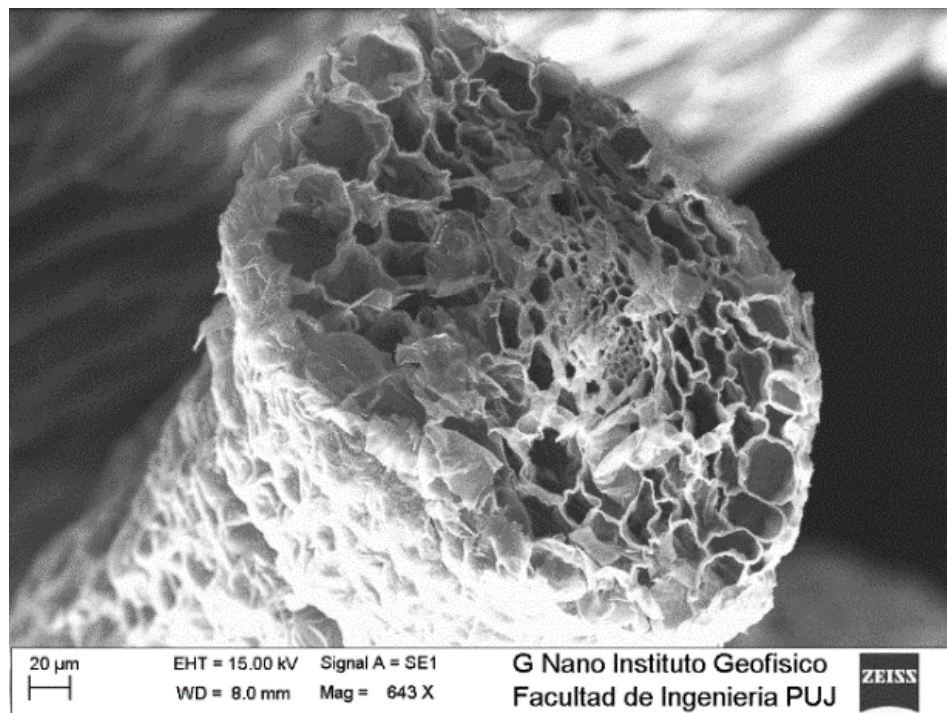


Figura 61. Microscopia óptica de raíz de Albahaca.

En las imágenes de microscopia electrónica se puede observar un corte transversal de las raíces de albahaca y se aprecia una morfología de células alargadas. En el corte transversal se observa una estructura canalizada a nivel longitudinal. Los canales son cilíndricos con tamaño en μm y permite el transporte de nutrientes en la planta para el desarrollo de funciones específicas. Con respecto a la morfología se aprecia una superficie porosa que le brinda un carácter de rugosidad y adsorción. También se observan células separadas que se superponen unas sobre otras como piezas individuales.



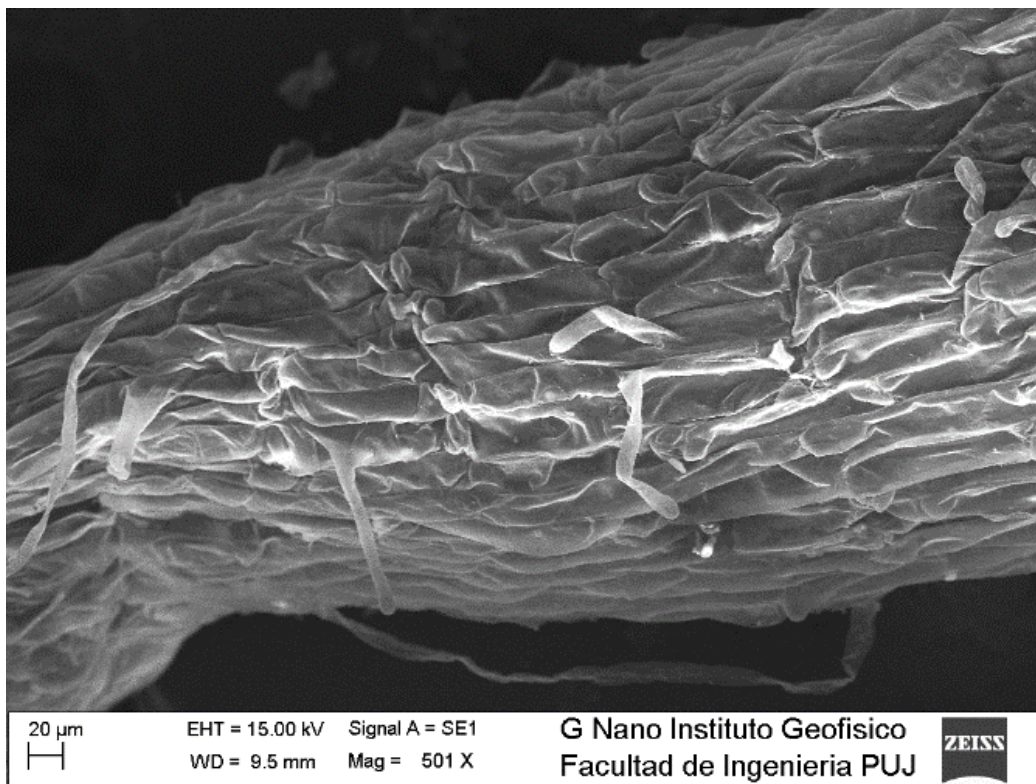


Figura 62. Microscopía óptica y electrónica SEM de raíces de plantas de albahaca.

En las raíces de albahaca la adsorción puede tener una estrecha relación con la morfología de las raíces como se muestra en la **Figura 62** en la cual se observa una morfología rugosa con células alargadas que brindan una gran área superficial para la adsorción de iones. La relación entre la morfología de las raíces o del tejido vegetal de bioacumulación es otro de parámetro que se debe considerar en estudios futuros de bioacumulación de metales pesados en plantas de consumo humano.

6.3.2 Detección de Cd^{2+} en raíces de albahaca con configuración radiométrica fluorescente RBOHD

Para el análisis de detección de Cd^{2+} en raíces de albahaca se seleccionaron al azar 3 plantas control y 3 plantas expuestas a Cd por cada repetición, en los días 3 y 14. De cada plántula se extrajeron las raíces cuidadosamente las cuales se sonicaron durante 20min para extraer los iones de Cd sujetos a la superficie de las raíces dentro de la solución de RBOHD (70-30%) y posteriormente se obtuvieron los espectros de absorbanza, emisión y excitación correspondientes a cada muestra.

Las absorbanzas y las intensidades de excitación fueron tomadas a una longitud de onda de 550nm y la intensidad de emisión a 576nm teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la configuración de la sonda radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) con el Cd. Los resultados se muestran en la **Tabla 34**.

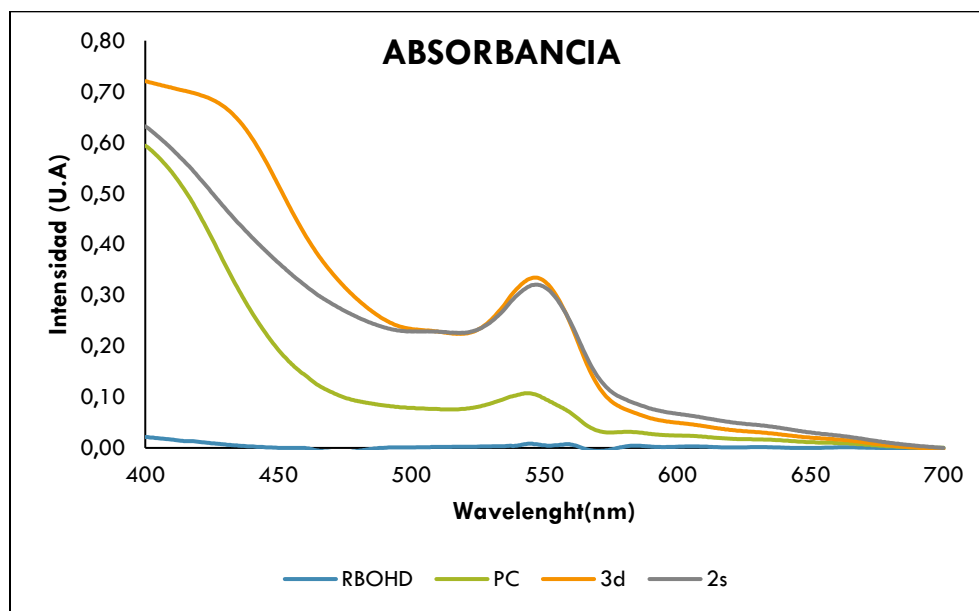
Tabla 34. Mediciones de absorbancia y excitación a una longitud de onda de 550nm y intensidades de emisión a una longitud de onda de 576nm.

Muestra	Abs (U.A)	Emisión (U.A)	Excitación (U.A)
RBOHD	0,005	1662,186	788,476
CONTROL	0,097	2806,676	7519,474
3D	0,328	4344,887	21407,294
2S	0,316	4187,323	16709,037

Los resultados obtenidos indican un aumento en la fluorescencia de la solución RBOHD (70-30%) con respecto a las plantas control y las plantas expuestas a Cd en los dos periodos de tiempo (3D, 2S). Aunque las plantas control no fueron expuestas a concentraciones de Cd es importante resaltar la presencia de nutrientes presentes en las raíces de la planta. En las respuestas de fluorescencia de la solución con diferentes metales se observó que la configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) permite la detección de otros elementos con menor intensidad y esto se refleja en los resultados obtenidos para las plantas control y las plantas expuestas a Cd.

Los resultados de las plantas expuestas a Cd tienen mayores intensidades de emisión en comparación al blanco (RBOHD) y las plantas control. Otro aspecto de gran relevancia es que las intensidades de emisión para la exposición de las plantas en los dos periodos de tiempo no muestran mucha diferencia, de hecho, la emisión a las dos semanas disminuye muy poco en comparación a los 3 días. Esto se debe a que la detección de Cd se realiza en superficie y es posible que la saturación de iones de Cd se presenta a los pocos días de exposición del metal en las raíces.

Los espectros de absorbancia, emisión y excitación de fluorescencia se muestran en la **Figura 63**. En los espectros de absorbancia y emisión se observa la cercanía de los picos de intensidad para los diferentes periodos de tiempo. También se observa que los picos de absorbancia y excitación de las raíces expuestas a Cd se encuentran en una longitud de onda de 550nm mientras que la intensidad muestra los valores máximos de intensidad a una longitud de 576nm, acorde a los resultados obtenidos con la solución RBOHD en presencia de Cd.



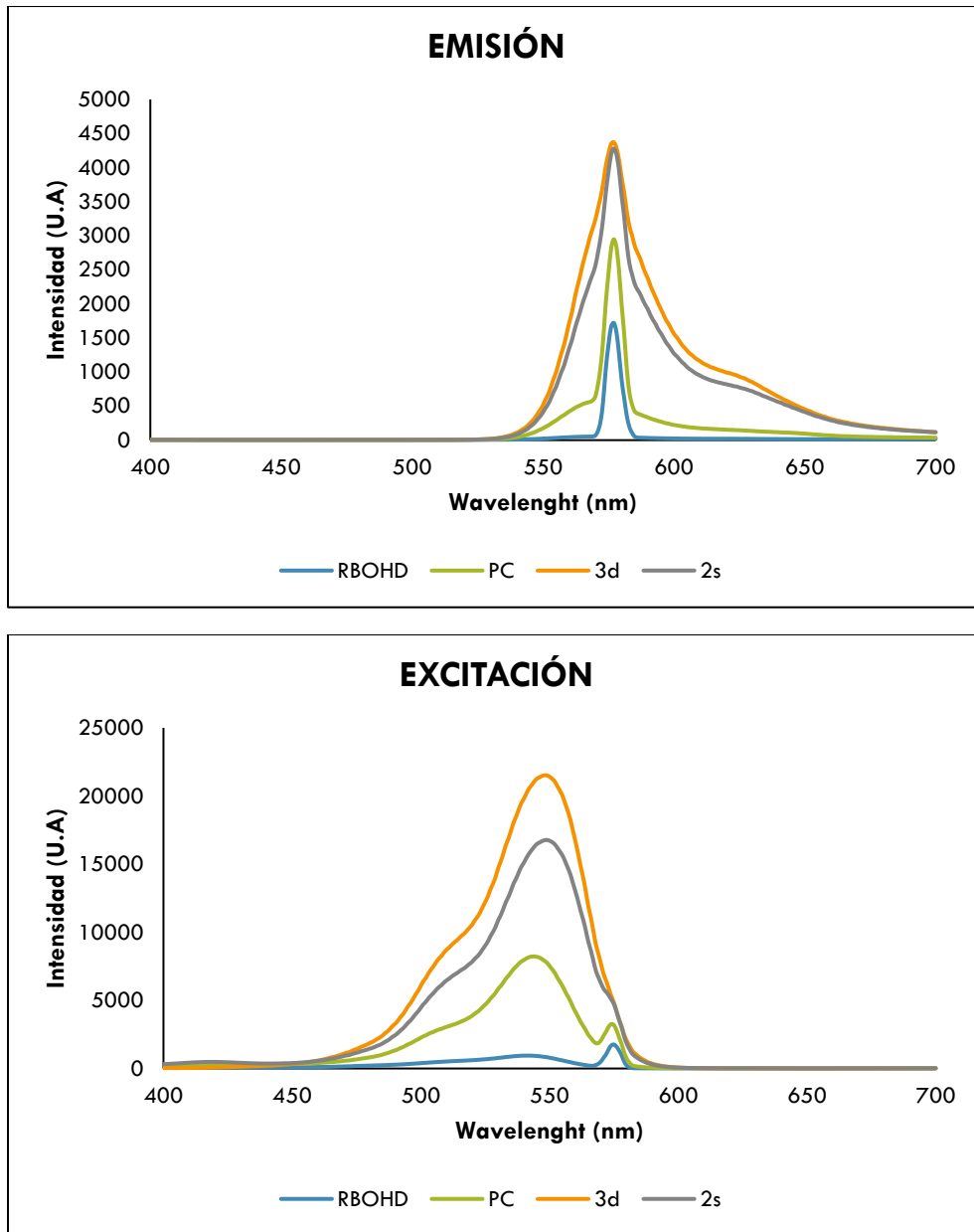


Figura 63. Espectros de absorbanca, emisión y excitación de fluorescencia de raíces control y raíces expuestas a Cd.

Con respecto a la colorimetría también se observaron cambios en las diferentes soluciones como se muestra en la **Figura 64**. La solución de referencia RBOHD muestra una tonalidad transparente mientras que para las raíces control la tonalidad cambia a amarillo y las raíces expuestas a Cd muestran una tonalidad café y en lampara fluorescente muestra una tonalidad cercana al rosa principalmente para las raíces que fueron expuestas durante 2 semanas.

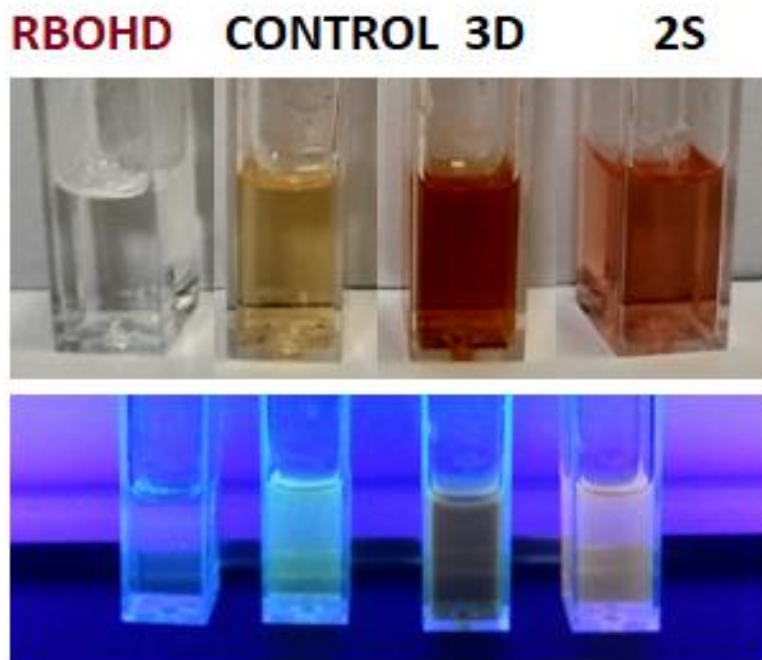


Figura 64. Colorimetría de la configuración radiométrica fluorescente (RBOHD) en raíces de plantas de albahaca control y raíces de plantas expuestas a Cd.

6.3.3 Rendimiento cuántico de configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) con iones de Cd²⁺ sujetos a raíces de albahaca.

Los resultados obtenidos para los rendimientos cuánticos se muestran en la **Tabla 35** con sus respectivas variables. El rendimiento cuántico de la solución de RBOH (0,97) fue obtenido a partir de la ecuación (4)¹⁸⁰ para determinar el rendimiento cuántico de la RBOHD. Los rendimientos cuánticos de las plantas control (control), las plantas expuestas a Cd durante 3 días (3d) y las plantas expuestas a Cd durante 2 semanas (2s) se determinaron tomando la solución de RBOHD como referencia. También se calcularon los coeficientes de rendimiento cuántico de la muestra y la referencia (φ_m/φ_r).

Tabla 35. Rendimiento cuántico de configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) con iones de Cd²⁺ sujetos a raíces de albahaca.

	Notación	RBOH	BLANCO RBOHD	CONTROL	3D	2S
a.b.c espectro de emisión	F	29487952,076	15722,118	49795,084	185665,605	156985,445
Absorbancia	A	0,431	0,005	0,097	0,328	0,316
Índice de refracción	η	1,361	1,473	1,473	1,362	1,362
Rend cuantico	ϕ	0,970	0,052	0,217	0,630	0,535
φ_m/φ_r	-	-	0,054	4,155	12,059	10,244

**a.b.c Área bajo la curva.

De los resultados obtenidos se puede observar que al agregar la molécula DETA a la solución de RBOH disminuye significativamente el rendimiento cuántico de 0,97 a 0,052. Los iones de nutrientes que se desprenden de las raíces de albahaca durante la sonicación mejoran el rendimiento pasando de 0,052 a 0,217. Las plantas que fueron expuestas a Cd indican rendimientos de 0,63 y 0,53 con una mejora de la eficiencia de la fluorescencia en 12,059 y 10,224 veces en comparación a la referencia (RBOHD).

Los valores de rendimiento cuántico se reportan entre 0 y 1 porque la relajación radiativa y la no radiativa se producen simultáneamente. Los valores más cercanos a 1 indican alta fluorescencia mientras que los valores más cercanos a 0 indican baja fluorescencia, sin embargo, los rendimientos varían de acuerdo con la molécula, el solvente, la síntesis entre otros aspectos.^{134,184}

Los rendimientos cuánticos obtenidos para las plantas expuestas a Cd fueron más altos que el rendimiento cuántico para las plantas control, lo cual indica que la configuración radiométrica fluorescente de RBOHD es altamente selectiva con el Cd. Además, se resalta la detección *In situ* de los iones de Cd en las raíces de albahaca como método de detección de Cd en plantas. Los valores obtenidos son altos en comparación a los reportados en literatura por Yang et.al 2011¹⁸⁵ con un valor de 0.0065 a 0.0145, Sun et.al¹⁶⁴ reportan un valor de 0.088 y Rasheed et.al 2018¹³⁷ reportan bajo rendimiento cuántico aunque no indican valor.

La adsorción de iones como resultado del primer experimento permitió el planteamiento del experimento de validación teniendo en cuenta la siguiente hipótesis: Si los iones de Cd se adhieren a la superficie de las raíces de albahaca por fuerzas electrostáticas entonces los iones se pueden desprender mediante un proceso mecánico como la sonicación y estos iones pueden ser detectados con la configuración radiométrica fluorescente de RBOHD (70-30%).

Con esta hipótesis se propuso el último experimento en el cual se conservaron las mismas condiciones que se emplearon en el estudio del sensor radiométrico fluorescente para detección de iones de Cd, en la cual las soluciones se sonicaron en ultrasonido por un tiempo de 20min a temperatura ambiente. En el experimento de validación las raíces control y las raíces expuestas a Cd conservaron las mismas condiciones.

Los espectros de absorbancia y excitación para las raíces expuestas a Cd mostraron picos en las longitudes de onda que se reportaron en la configuración del sensor radiométrico fluorescente para detección de Cd. Además, los rendimientos cuánticos obtenidos indicaron que la solución puede detectar otro tipo de iones sujetos a la raíz, pero es altamente selectiva a los iones de Cd (ver **Tabla 35**).

6.4 CONCLUSIONES

6.4.1 OBJETIVO 1-2

- La falta de estudios de contaminación por metales pesados plantea la urgente necesidad de incrementar esfuerzos a nivel Nacional y Local (Sabana de Bogotá) en tareas de monitoreo, diagnóstico e investigación sobre movilidad y bioacumulación de Cd en plantas de consumo humano, aspecto de gran trascendencia para garantizar seguridad alimentaria y calidad de vida.
- Las concentraciones de Cd en las diferentes especies: albahaca (0.1008 mg/l), hierbabuena (0.0737 mg/l), zanahoria (0.0466mg/l) y espinaca (0.0566 mg/l) obtenidas en el estudio, excedieron los límites mínimos permitidos establecidos para especies vegetales según lo indicado en el codex Alimentarius, comprendidos entre 0.01mg/l y 0.05 mg/l. Estos resultados, resaltan la necesidad de

desarrollar estudios de bioacumulación desde diferentes enfoques para una mejor comprensión de la fenomenología y los procesos involucrados.

- El factor de bioacumulación (BFC) en la albahaca registra un valor de 1.049 lo que la clasifica como acumuladora de este metal y el factor de translocación se reduce drásticamente cuando la concentración del Cd aumenta, lo cual indica que la albahaca puede retener el elemento en las raíces afectando la translocación de micronutrientes de interés para el proceso fisiológico y morfológico.
- Los resultados obtenidos en esta fase de estudio permiten concluir que la albahaca a pesar de ser acumuladora de Cd, los efectos de toxicidad causados por este metal no permiten que pueda ser utilizada como fitoremediadora. Sin embargo, los cambios presentados en hojas y tallos en función de las concentraciones bioacumuladas de Cd la hacen una prometedora opción para sensado de este metal por esta vía.
- En este estudio se concluye que la mayor concentración de Cd se produce en raíz.

6.4.2 OBJETIVO 3

- La RBOHD (70-30%) es una configuración radiométrica fluorescente tipo OFF- ON que permite la detección de Cd en un rango comprendido entre 10 y 1000 $\mu\text{g/l}$, lo cual hace viable la configuración de sensado de metales pesados en plantas, porque el límite mínimo permisible de contaminación de Cd en vegetales de tallo y hoja es de 0,01ppm equivalente a 10 $\mu\text{g/l}$ según lo establecido por el *Codex alimentarius*.
- Para concentraciones de Cd entre 100 y 1000 $\mu\text{g/l}$ se observa un cambio de tonalidad -de transparente a rosa- durante un tiempo aproximado de 6h. Esto permite detectar concentraciones que se encuentran por encima del límite mínimo permisible para Cd, permitiendo identificar fuentes emisoras de contaminación de Cd en plantas de consumo humano.
- La respuesta de la configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30%) es rápida y selectiva para el Cd en presencia del Zn, Hg, Pb y Cu, sin que estos metales produzcan alteración o pérdida de selectividad, lo cual favorece tareas de detección *In situ* del metal de selección en plantas de albahaca.

6.4.3 OBJETIVO 4

- De acuerdo con los estudios de vigilancia tecnológica realizados, se hace posible concluir que en Colombia la investigación sobre albahaca -contaminación, procesos de bioacumulación de contaminantes, detección de contaminantes, toxicidad, entre otros-, es incipiente, o casi nula. Por tal motivo, se requiere con urgencia incrementar acciones investigativas orientadas a atender esta problemática de gran impacto para el país y en particular, para la Sabana de Bogotá. Este trabajo propone una primera aproximación hacia la comprensión de los mecanismos de transferencia y bioacumulación de metales pesados en órganos específicos de plantas de consumo humano.
- El lugar de actuación del agua de riego con la planta es otro de los factores que se deben tener en cuenta en los estudios fenomenológicos de bioacumulación asociados a la morfología de las plantas. En las imágenes se observó que las raíces de albahaca presentan una morfología rugosa con una amplia área superficial en las células de la rizodermis y las condiciones experimentales siempre mantuvieron un estrecho contacto entre las raíces con los iones de Cd.
- El proceso de adsorción y la configuración radiométrica fluorescente que se determinó permitió establecer un método de detección *In situ* de Cd en raíces de plantas de albahaca con rendimientos cuánticos de fluorescencia significativos 0.63 y 0.53 que indican especificidad del metal. Además, estos rendimientos son superiores a los rendimientos reportados en algunos trabajos los cuales se encuentran en valores menores a 0.1.
- Los resultados obtenidos permiten concluir que la fijación preferencial del Cd -para los tiempos de exposición indicados- se produce en la superficie externa de la raíz. Esto es de trascendental importancia para comprender la movilidad y bioacumulación del Cd en la raíz de la albahaca. De otra parte, esto permite diseñar estrategias de sensado *in Situ*, ya que la detección se puede hacer de manera directa en raíz.

7 PROYECCIONES

- El estudio fenomenológico de bioacumulación de metales pesados tales como el Cd, en plantas específicas permite identificar variables biológicas y fisicoquímicas que intervienen en el proceso de translocación para el desarrollo de modelos matemáticos que permitan tener una predicción de bioacumulación más acorde a la realidad. Actualmente se están desarrollando modelos basados en “modelos de transferencia suelo-planta” para predecir bioacumulación de Cd en granos de arroz, teniendo en cuenta variables del suelo tales como pH y capacidad de intercambio catiónico.^{186,187} Sin embargo, los resultados pueden mejorar si se tienen en cuenta características de la planta, especiación química y microorganismos presentes en el sistema, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de diferentes trabajos experimentales que reportan bioacumulación en tejidos de plantas específicas.
- La colorimetría de la configuración radiométrica fluorescente puede ser una variable para estudiar para la detección *In situ* de otros iones metálicos como Hg, As, Pb entre otros. Por ejemplo, se pueden emplear reactivos que al interactuar con iones específicos cambien la colorimetría de la solución y permitan una detección selectiva múltiple.
- El estudio de la configuración radiométrica fluorescente RBOHD (70-30) motiva el desarrollo de sistemas de sensado para detección y cuantificación *In situ* de iones metálicos en plantas que permitan mejorar procesos de cultivo con altos estándares de calidad e inocuidad de alimentos.

8 ABREVIATURAS

etOH.	Etanol
QY.	Quinolina Yellow
QYH.	Quinolina Yellow disuelta en agua mili Q
QYOH.	Quinolina Yellow disuelta en etanol
MT.	Metalotioneinas
PCs.	Fitoquelatinas
RB.	Rodamina B
RBH.	Rodamina B disuelta en agua mili Q
RBOH.	Rodamina B disuelta en etanol
RBOHD (70-30%).	Rodamina B disuelta en etanol y molécula DETA a radios de volumen: RBOH-DETA 70-30%

9 GLOSARIO DE TÉRMINOS

Analito. Agente químico bajo estudio (p.ej. arsénico) disuelto en agua.

Difusión: Movimiento de partículas de regiones de mayor concentración a regiones de menor concentración.

Difusión simple: Cuando agua, gases disueltos y moléculas liposolubles se difunden por la bicapa lipídica.

Difusión facilitada: Se emplean proteínas de transporte para el movimiento de agua o moléculas disueltas siguiendo el gradiente de concentración sin necesidad de requerir energía en el proceso.

Efecto fitotóxico. Trastorno vegetativo causado por la absorción de determinados iones que la planta toma con el agua de riego

Energía libre: Energía disponible sin cambio de temperatura para efectuar trabajo.

Enzima: Biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy buenas catalizadoras porque pueden aumentar la velocidad de las reacciones químicas

Funcionalización: Proceso de agregar nuevas funciones, características, capacidades o propiedades a un material mediante el cambio químico de su superficie.

Ligandos: iones o moléculas que se unen a un átomo de metal central para formar un complejo de coordinación

Nanosensor. La función principal de un nanosensor es la de detectar y medir de la señal producida en la interacción entre el elemento de reconocimiento (receptor) y el analito de interés (muestra), como resultado se obtienen cambios en parámetros físicos y químicos que detecta el transductor, el cual transforma la respuesta del receptor en una señal electrónica la cual indica presencia del analito en estudio; entre los parámetros observados por un sensor se encuentran el pH, cantidad de calor, variación de masa, variación de propiedades ópticas, etc.) Un nanosensor debe ser preciso, rápido, portátil, fácil de manipular, sensible a la muestra, susceptible a ser manejado de manera remota, debe tener bajo costo y tiempo de vida largo, es de aclarar que un sensor debe no interactuar con compuestos que no sean de su interés.

Osmosis: Difusión del agua por la membrana permeable selectiva, siguiendo el gradiente de concentración por la bicapa lipídica o por las acuaporinas.

Potencial químico: Mide la energía con la cual reaccionará o se moverá una sustancia.

Plantas metalofitas: Plantas que desarrollan mecanismos para tolerar suelos altamente contaminados por un elemento químico. En esta categoría se encuentran las plantas hiperacumuladoras

Soluto: Sustancia que puede disolverse (dispersarse en átomos, moléculas o iones individuales)

Superficie sensora. La superficie sensora está conformada por una lámina de vidrio sobre la que se crece una película nano estructurada de oro tipo fcc (111) en la que se deposita una capa molecular capaz de reconocer y fijar el analito (arsénico).

10 REFERENCIAS

1. Hua M, Zhang S, Pan B, Zhang W, Lv L, Zhang Q. Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: A review. *J Hazard Mater.* 2012;211-212:317-331. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.016
2. Kobya M, Demirbas E, Senturk E, Ince M. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. *Bioresour Technol.* 2005;96(13):1518-1521. doi:10.1016/j.biortech.2004.12.005
3. Meharg AA. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. 2002:29-43.
4. Smolders E. Cadmium uptake by plants. *Int J Occup Med Environ Health.* 2001;14(2):177-183.
5. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, Xiong T. Foliar heavy metal uptake , toxicity and detoxification in plants : A comparison of foliar and root metal uptake. *J Hazard Mater.* 2017;325:36-58. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.11.063
6. Li F, Shi W, Jin Z, Wu H, Sheng GD. Excessive uptake of heavy metals by greenhouse vegetables. *J Geochemical Explor.* 2017;173:76-84. doi:10.1016/j.gexplo.2016.12.002
7. Singh A, Sharma RK, Agrawal M, Marshall FM. Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *Trop Ecol.* 2010;51(2 SUPPL.):375-387. doi:10.1016/j.fct.2009.11.041
8. Miranda. Diego, Carranza. Carlos FG. *CALIDAD DEL AGUA DE RIEGO EN LA SABANA DE BOGOTÁ.* Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Agronomía. Grupo de Horticultura.; 2008.
9. Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurociencias.* 2011;16(3):140-147.
10. Karak T, Bora K, Kumar R, et al. Paradigm shift of contamination risk of six heavy metals in tea (*Camellia sinensis* L .) growing soil : A new approach influenced by inorganic and organic amendments. *J Hazard Mater.* 2017;338:250-264. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.05.036
11. Esetlili BÇ, Pekcan T, Çobanoğlu Ö, Aydoğdu E, Turan S, Anac D. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Ağırlıkça Metal ve Temel Besin Elementleri İçerikleri. 2013.
12. Y. Reyes, I. Vergara, O. Torres, M. Díaz EG. CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS : IMPLICACIONES EN SALUD , AMBIENTE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA. *Rev Ing Investig y Desarro.* 2016;16:66-77.
13. Miranda D, Carranza C, Rojas CA, Jerez CM, Fischer G, Zurita J. Acumulación de metales pesados en suelo y plantas de cuatro cultivos hortícolas , regados con agua del río Bogotá. *Rev Colomb Ciencias Hortícolas.* 2008;2(2):180-191. doi:10.17584/rcch.2008v2i2.1186
14. Publishing I, Salinas S, Mosquera N, et al. Sensors & Transducers Surface Plasmon Resonance Nanosensor for the Detection of Arsenic in Water. 2014;183(12):97-102.
15. Salinas. N, Mosquera. L, Yates. E, Coy. G, Yamhure & E.González S. Autonomus nanosensor system for monitoring and quantifying arsenic in water. *Proc 2014 NSTI Nanotechnol Conf Expo, NSTI-Nanotech.* 2014;3:170-173.

16. Reyes, Coy, E. Yate, L. Jurga, S and E. González Y. Nanostructured and selective filter to improve detection of arsenic on surface plasmon nanosensors. *ACS Sensors*. 2016.
17. Selid PD, Xu H, Collins EM, Face-collins MS, Zhao JX. Sensing Mercury for Biomedical and Environmental Monitoring. 2009:5446-5459. doi:10.3390/s90705446
18. El-Safty SA, Shenashen MA, El-Safty SA. Mercury-ion optical sensors. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2012;38(September):98-115. doi:10.1016/j.trac.2012.05.002
19. Verma N, Singh M. Biosensors for heavy metals. *Springerplus*. 2005;18:121-129. doi:10.1007/s10534-004-5787-3
20. Vymazal J, Březinová T. Heavy metals in plants in constructed and natural wetlands: Concentration, accumulation and seasonality. *Water Sci Technol*. 2015;71(2):268-276. doi:10.2166/wst.2014.507
21. Li N, Kang Y, Pan W, Zeng L, Zhang Q, Luo J. Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Sci Total Environ*. 2015;521-522:144-151. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.081
22. Chen Y, Hu W, Huang B, et al. Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013;98:324-330. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.09.037
23. Huang Z, Pan XD, Wu PG, Han JL, Chen Q. Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control*. 2014;36(1):248-252. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.036
24. Li R, Wu H, Ding J, Fu W, Gan L, Li Y. Mercury pollution in vegetables, grains and soils from areas surrounding coal-fired power plants. *Sci Rep*. 2017;7(March):1-9. doi:10.1038/srep46545
25. Ahmad K, Wajid K, Khan Zi, et al. Evaluation of Potential Toxic Metals Accumulation in Wheat Irrigated with Wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2019;102(6):822-828. doi:10.1007/s00128-019-02605-1
26. Ozyigit II, Yalcin B, Turan S, et al. Investigation of Heavy Metal Level and Mineral Nutrient Status in Widely Used Medicinal Plants' Leaves in Turkey: Insights into Health Implications. *Biol Trace Elem Res*. 2018;182(2):387-406. doi:10.1007/s12011-017-1070-7
27. Inoue M, Craker LE. Horticulture: Plants for People and Places. In: Dixon G. AD, ed. *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 2: Environmental Horticulture*. Vol 2. Springer, Dordrecht; 2014:vii-x. doi:10.1007/978-94-017-8581-5
28. Restrepo LF, Gomez LM, De-Ossa GC. Knowledge and Aromatic Drink Consumption in Youth in the City of Medellín-Colombia. *Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial*. 2012;10(1):87-97.
29. Inoue M, Hayashi S, Craker LE. Role of Medicinal and Aromatic Plants: Past, Present, and Future. In: Drahanovsky M, Paridah M., Moradbak A, et al., eds. *Pharmacognosy-Medicinal Plants*. IntechOpen. ; 2019:1-13. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
30. Yang B, Gao Y, Zhang C, Zheng X, Li B. Mercury accumulation and transformation of main leaf vegetable crops in Cambosol and Ferrosol soil in China. *Environ Sci Pollut Res*. 2019. doi:10.1007/s11356-019-06798-0
31. Allevato E, Stazi SR, Marabottini R, D'Annibale A. Mechanisms of arsenic assimilation by plants and countermeasures to attenuate its accumulation in crops other than rice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;185(August):109701. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109701

32. Ghosh R, Roy S. *Cadmium Toxicity in Plants*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-815794-7.00008-4
33. Manoj SR, Karthik C, Kadirvelu K, et al. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *J Environ Manage*. 2020;254(October 2019):109779. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109779
34. Clemens S, Ma JF. Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annu Rev Plant Biol*. 2016;67:489-512. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-112301
35. Chen J, Min Z, Small TÁ, Gene RNAÁ. Mercury toxicity , molecular response and tolerance in higher plants. 2012;847-857. doi:10.1007/s10534-012-9560-8
36. Qin S, Liu H, Nie Z, et al. Toxicity of cadmium and its competition with mineral nutrients for uptake by plants : A review. *Pedosph An Int J*. 2020;30(2):168-180. doi:10.1016/S1002-0160(20)60002-9
37. Casa NM, Río LA, Sandalio LM. Toxicidad del Cadmio en Plantas. 2008;17(3):139-146.
38. Piršelová B, Kuna R, Lukáč P, Havrlentová M. EFFECT OF CADMIUM ON GROWTH , PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS , IRON AND CADMIUM ACCUMULATION OF FABA BEAN (VICIA FABA CV . AŠTAR). 2016;2016(2). doi:10.1515/agri-2016-0008
39. Jaskulak M, Grobelak A. *Cadmium Phytotoxicity—Biomarkers*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-815794-7.00006-0
40. Amir R, Munir F, Kubra G, Iqbal T, Khan M. *Plant Signaling Molecules and Cadmium Stress Tolerance*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-815794-7.00014-x
41. Rady MM, Ahmed SMA, Seif El-Yazal MA, Taie HAA. *Alleviation of Cadmium Stress in Wheat by Polyamines.*; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-815794-7.00017-5
42. Roy S. *Cadmium Accumulation in Crops and the Increasing Risk of Dietary Cadmium Exposure*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-815794-7.00009-6
43. Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. In: *Fisiologia Vegetal*. Artmed; 2009.
44. Azevedo R, Rodriguez E. Phytotoxicity of Mercury in Plants : A Review. 2012;2012. doi:10.1155/2012/848614
45. Williams LE, Pittman JK, Hall JL. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. 2000;1465:104-126.
46. Zhang XD, Zhao KX, Yang ZM. Identification of genomic ATP binding cassette (ABC) transporter genes and Cd-responsive ABCs in Brassica napus. *Gene*. 2018;664(December 2017):139-151. doi:10.1016/j.gene.2018.04.060
47. Singh PK, Indoliya Y, Chauhan AS, et al. Nitric oxide mediated transcriptional modulation enhances plant adaptive responses to arsenic stress. *Sci Rep*. 2017;7(1):3592. doi:10.1038/s41598-017-03923-2
48. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*. 2006;88(11):1707-1719. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.003
49. Kumar SS, Kadier A, Malyan SK, Ahmad AA, Bishnoi NR. Phytoremediation and Rhizoremediation: Uptake, Mobilization and Sequestration of Heavy Metals by Plants. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, . ; 2017:367-394. doi:10.1007/978-981-10-6593-4
50. Gupta DK, Corpas FJ, Palma JM. *Heavy Metal Stress in Plants.*; 2013. doi:10.1007/978-3-642-38469-1
51. Adamczyk-Szabela D, Romanowska-Duda Z, Lisowska K, Wolf WM. Heavy Metal Uptake by Herbs. V.

- Metal Accumulation and Physiological Effects Induced by Thiuram in *Ocimum basilicum* L. *Water Air Soil Pollut.* 2017;228(9). doi:10.1007/s11270-017-3508-0
52. Song Y, Jin L, Wang X. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int J Phytoremediation.* 2017;19(2):133-141. doi:10.1080/15226514.2016.1207598
 53. Yan YY, Yang B, Lan XY, Li XY, Xu FL. Cadmium accumulation capacity and resistance strategies of a cadmium-hypertolerant fern — *Microsorium fortunei*. *Sci Total Environ.* 2019;649:1209-1223. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.281
 54. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, Xiong T. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *J Hazard Mater.* 2017;325:36-58. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.11.063
 55. Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Andrews S, Megharaj M. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol Indic.* 2017;74:451-462. doi:10.1016/j.ecolind.2016.12.004
 56. Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. 2013.
 57. Gontia-Mishra I, Sapre S, Sharma A, Tiwari S. Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul.* 2016;35(4):1000-1012. doi:10.1007/s00344-016-9598-x
 58. Zhang T, Lu Q, Su C, Yang Y, Hu D, Xu Q. Mercury induced oxidative stress, DNA damage, and activation of antioxidative system and Hsp70 induction in duckweed (*Lemna minor*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;143(April):46-56. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.058
 59. Verbruggen N, Hermans C, Schat H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12(3):364-372. doi:10.1016/j.pbi.2009.05.001
 60. Datta R, Das P, Tappero R, et al. Evidence for exocellular Arsenic in Fronds of *Pteris vittata*. *Sci Rep.* 2017;7(1):2839. doi:10.1038/s41598-017-03194-x
 61. Chen G, Liu X, Brookes PC, Xu J. Opportunities for Phytoremediation and Bioindication of Arsenic Contaminated Water Using a Submerged Aquatic Plant: *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara. *Int J Phytoremediation.* 2015;17(3):249-255. doi:10.1080/15226514.2014.883496
 62. Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ Exp Bot.* 2012;83(November):33-46. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.04.006
 63. Clemens S, Clemens S, Palmgren MG, Kr U. engineering plant metal accumulation A long way ahead : understanding and engineering plant metal accumulation. 2002;1385(August). doi:10.1016/S1360-1385(02)02295-1
 64. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environ Pollut.* 1997;98(1):29-36. doi:10.1016/S0269-7491(97)00110-3
 65. Rizwan M, Ali S, Adrees M, et al. A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere.* 2017;182:90-105. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.013
 66. Peralta-vidua JR, Laura M, Narayan M, Saupé G, Gardea-torresdey J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants : Implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:1665-1677. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.005
 67. Hortalizas con exceso de metales pesados. cvne (Centro virtual de noticias de la educación).
 68. Torres MP. Exceso de tóxicos en hortalizas de la Sabana. 126.

<http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/exceso-de-toxicos-en-hortalizas-de-la-sabana.html>. Published 2009.

69. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. *Codex Stan 193-1995*. 2009:76. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf.
70. FAO. Codex Alimentarius. Código De Prácticas Para La Prevención Y Reducción De La Contaminación Por. 2017. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2B77-2017%252FCXC_077s.pdf.
71. Giraldo H. *Plantas Aromáticas, Medicinales, Condimentarias y Afines - PAMCYA*. Bogotá. Colombia; 2014.
72. *Cadena de Plantas Aromaticas, Medicinales, Condimentarias y Afines*. Bogotá. Colombia; 2016.
73. Hugret R. Determinación cuantitativa de metales pesados en cinco especies vegetales en bolsas filtrantes para infusiones expandidas en Lima Metropolitana. 2014.
74. Caldas ED, Machado LL. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(4):599-603. doi:10.1016/j.fct.2003.11.004
75. Akram S, Najam R, Rizwani GH, Abbas SA. Determination of heavy metal contents by atomic absorption spectroscopy (AAS) in some medicinal plants from Pakistani and Malaysian origin. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28(5):1781-1787.
76. Okem A, Southway C, Stirk WA, Street RA, Finnie JF, Van Staden J. Heavy metal contamination in South African medicinal plants: A cause for concern. *South African J Bot*. 2014;93:125-130. doi:10.1016/j.sajb.2014.04.001
77. Bua DG, Annuario G, Albergamo A, Cicero N, Dugo G. Heavy metals in aromatic spices by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Addit Contam Part B*. 2016;9(3):210-216. doi:10.1080/19393210.2016.1175516
78. Zheljzkov VD, Craker LE, Xing B, Nielsen NE, Wilcox A. Aromatic plant production on metal contaminated soils. *Sci Total Environ*. 2008;395(2-3):51-62. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.01.041
79. Singh AS, Lal EP. Effect of Different Cadmium Concentrations on Seed Germination of *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). 2018;4(5):51-54.
80. Alamo-Nole L, Su YF. Translocation of cadmium in *Ocimum basilicum* at low concentration of CdSSe nanoparticles. *Appl Mater Today*. 2017;9:314-318. doi:10.1016/j.apmt.2017.08.014
81. Bishekolaei R, Fahimi H, Saadatmand S, Nejadstari T, Lahouti M, Yazdi FT. Ultrastructural localisation of chromium in *Ocimum basilicum*. *Turk J Botany*. 2011;35(3):261-268. doi:10.3906/bot-1002-50
82. Bekiaroglou P, Karataglis S. The Effect of Lead and Zinc on *Mentha spicata*. *October*. 2002;205:201-205.
83. Infoagro. El cultivo de la zanahoria. <http://www.infoagro.com/hortalizas/zanahoria.htm>. Published 2017.
84. Cámara de Comercio de Bogotá. Manual Zanahoria. 2015:1-50. <https://www.ccb.org.co/>.
85. Stasinou S, Nasopoulou C, Tsirikaki C, Zabetakis I. The Bioaccumulation and Physiological Effects of

- Heavy Metals in Carrots, Onions, and Potatoes and Dietary Implications for Cr and Ni: A Review. *J Food Sci.* 2014;79(5). doi:10.1111/1750-3841.12433
86. Hooda PS, Alloway BJ. The effect of liming on heavy metal concentrations in wheat, carrots and spinach grown on previously sludge-applied soils. *J Agric Sci.* 1996;127(3):289-294. doi:10.1017/S0021859600078448
 87. Arias LA, Espinosa L, Fuentes LS, Gil R. El cultivo de la espinaca (*Spinacea oleracea* L.) y su manejo fitosanitario en Colombia. 2010.
 88. Casierra Posada, Fánor (Plant Ecophysiology Research Group, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia , UPTC. Tunja C fanor. casierra@uptc. edu. co., Ulrichs, Christian (Division Urban Plant Ecophysiology, Faculty for Agriculture and Horticulture, Universität zu Berlin. Berlin G, Pérez, Cristian(Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires AF of VS. growth of spinach plants (*Spinacia oleracea* l.) exposed to excess zinc and manganese. *Agron Colomb.* 2012;30(3):344-350. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/28014>.
 89. Liu Z, Wang L, Xu J, Ding S, Feng X, Xiao H. Effects of different concentrations of mercury on accumulation of mercury by five plant species. *Ecol Eng.* 2017;106:273-278. doi:10.1016/j.ecoleng.2017.05.051
 90. Mirosławski J, Paukszto A. Determination of the cadmium, chromium, nickel, and lead ions relays in selected polish medicinal plants and their infusion. *Biol Trace Elem Res.* 2018;182(1):147-151. doi:10.1007/s12011-017-1072-5
 91. Sandhi A, Landberg T, Greger M. Phytofiltration of arsenic by aquatic moss (*Warnstorfia fluitans*). *Environ Pollut.* 2018;237(November):1098-1105. doi:10.1016/j.envpol.2017.11.038
 92. Sut-lohmann M, Jonczak J, Raab T. Ecotoxicology and Environmental Safety Phytofiltration of chosen metals by aquarium liverwort (*Monosoleum tenerum*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;188(November 2019):109844. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109844
 93. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environ Chem Lett.* 2010;8(3):199-216. doi:10.1007/s10311-010-0297-8
 94. Lora Silva R, Bonilla Gutiérrez H. Remediación de un suelo de la cuenca alta del río Bogotá contaminado con los metales pesados cadmio y cromo. *Rev UDCA Actual y Divulg Científica.* 2010;13(2):61-70. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
 95. Davodpour R, Sobhanardakani S, Cheraghi M, Abdi N, Lorestani B. Honeybees (*Apis mellifera* L.) as a Potential Bioindicator for Detection of Toxic and Essential Elements in the Environment (Case Study: Markazi Province, Iran). *Arch Environ Contam Toxicol.* 2019;77(3):344-358. doi:10.1007/s00244-019-00634-9
 96. Dinu C, Vasile GG, Buleandra M, Popa DE, Gheorghe S, Ungureanu EM. Translocation and accumulation of heavy metals in *Ocimum basilicum* L. plants grown in a mining-contaminated soil. *J Soils Sediments.* 2020:90-92. doi:10.1007/s11368-019-02550-w
 97. Medina Marcos, K. D., Chávez, M., & Nayclin Y. *Determinación Del Factor de Bioconcentración y Traslocación de Metales Pesados En El Juncus Arcticus Willd. y Cortaderia Rudiusscula Stapf, de Áreas Contaminadas Con El Pasivo Ambiental Minero Alianza-Ancash 2013.; 2014.*
 98. Clemens S, Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. 2016;(September). doi:10.1007/s004250000458

99. Boyd RS, Martens SN, Boyd RS, Martens SN, Nickel SN. Nordic Society Oikos Nickel Hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* Var . *montanum* Is Acutely Toxic to an Insect Herbivore Published by : Wiley on behalf of Nordic Society Oikos Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3545694> REFERENCES Linked references ar. 2016;70(1):21-25.
100. Nouairi I, Jalali K, Essid S, Zribi K, Mhadhbi H. Alleviation of cadmium-induced genotoxicity and cytotoxicity by calcium chloride in faba bean (*Vicia faba* L. var. *minor*) roots. *Physiol Mol Biol Plants*. 2019;25(4):921-931. doi:10.1007/s12298-019-00681-5
101. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*. 2015;6:260-271. doi:10.1016/j.redox.2015.08.010
102. Jalmi SK, Bhagat PK, Verma D, et al. Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Front Plant Sci*. 2018;9(February):1-21. doi:10.3389/fpls.2018.00012
103. Zahedifar M, Moosavi AA, Zarei Z, Shafigh M, Karimian F. Heavy metals content and distribution in basil (*Ocimum basilicum* L.) as influenced by cadmium and different potassium sources. *Int J Phytoremediation*. 2019;21(5):435-447. doi:10.1080/15226514.2018.1537253
104. Sperotto RA, Menguer PK, Ricachenevsky FK. Molecular Bases of Iron Accumulation Towards the Development of Iron-Enriched Crops. In: *Plant Micronutrient Use Efficiency*. ; 2018:17-53.
105. Castro PH, Lilay GH, Assunção AGL. Regulation of Micronutrient Homeostasis and Deficiency Response in Plants. In: *Plant Micronutrient Use Efficiency Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants*. ; 2018:1-10.
106. Chatzistathis T. *Physiological Importance of Manganese, Cobalt and Nickel and the Improvement of Their Uptake and Utilization by Plants*. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-812104-7.00008-3
107. Ambika Asati¹, Mohnish Pichhode², and Kumar Nikhil³. Effect of Heavy Metals on Plants: An Overview. *Int J Appl or Innov Eng Manag*. 2016;5(3):2319-4847.
108. Grobelak A, Świątek J, Murtaś A, Jaskulak M. Cadmium-Induced Oxidative Stress in Plants, Cadmium Toxicity, and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation. *Cadmium Toxic Toler Plants*. 2019:213-231. doi:10.1016/B978-0-12-814864-8.00009-7
109. Borsari M. Cadmium: Coordination Chemistry. *Encycl Inorg Bioinorg Chem*. 2014:1-16. doi:10.1002/9781119951438.eibc2261
110. Lund E, Krezoski S, Petering D. The Chemical Biology of Cadmium. In: *Cadmium Interaction with Animal Cells*. Springer. Springer International Publishing; 2018:23-52.
111. Traina SJ. The Environmental Chemistry of Cadmium. *Cadmium in Soils and Plants*. 1999:11-37. doi:10.1007/978-94-011-4473-5_2
112. Maret W, Moulis J-M. The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of Its Toxicity. In: *Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences*. Vol 11. ; 2003:589. doi:10.1007/978-94-007-5179-8
113. Gómez DE. [1] D. E. Gómez, "Complejación de Plomo(II) y Cadmio (II) Con Nuevos Receptores Marocíclicos Derivados de Azacoronandos," 2002. *Complejación de Plomo(II) y Cadmio (II) Con Nuevos Receptores Marocíclicos Derivados de Azacoronandos*. Vol 3.; 2002. <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>.
114. Crea F, Foti C, Milea D, Sammartano S. Speciation of Cadmium in the Environment. In: *Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences*. ; 2003:589.

115. P. Marianela EV. ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS POR RIZOBACTERIAS QUE SOLUBILIZAN FOSFATO : UNA REVISIÓN CRÍTICA Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria : A Critical Review. *Terra Latinoam*. 2010;28:61-70.
116. Fan W, Liu C, Cao B, Qin M, Long D, Xiang Z. Genome-Wide Identification and Characterization of Four Gene Families Putatively Involved in Cadmium Uptake , Translocation and Sequestration in Mulberry. 2018;9(June):1-16. doi:10.3389/fpls.2018.00879
117. Jones, R., Ougham, H., Thomas, H. & W. *The Molecular Life of Plantas*. Wiley-Blac.; 2012.
118. Navarro-Aviñó JP, Aguilar Alonso I, López-Moya JR. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 2007;16(2):10-25.
119. Maleki M, Ghorbanpour M, Kariman K. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene*. 2017;11(April):247-254. doi:10.1016/j.plgene.2017.04.006
120. Cobbett C, Goldsbrough P. P <sc>HYTOCHELATINS AND</sc> M <sc>ETALLOTHIONEINS</sc> : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. 2002;53(1):159-182. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
121. Mekawy AMM, Assaha DVM, Munehiro R, et al. Characterization of type 3 metallothionein-like gene (OsMT-3a) from rice, revealed its ability to confer tolerance to salinity and heavy metal stresses. *Environ Exp Bot*. 2018;147:157-166. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.12.002
122. Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J Biol Inorg Chem*. 2006;11(1):2-12. doi:10.1007/s00775-005-0056-7
123. Park C, Jeong J. Synergistic cellular responses to heavy metal exposure: A minireview. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2018;1862(7):1584-1591. doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.003
124. Rabêloa FHS, Ferniec AR, Navazasb A, et al. A glimpse into the effect of sulfur supply on metabolite profiling, glutathione and phytochelatins in Panicum maximum cv. Massai exposed to cadmium. *Environ Exp Bot*. 2018;151:76-88.
125. Oono Y, Yazawa T, Kanamori H, et al. Genome-wide transcriptome analysis of cadmium stress in rice. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/9739505
126. Uraguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, et al. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(52):20959-20964. doi:10.1073/pnas.1116531109
127. Shao JF, Xia J, Yamaji N, Shen RF, Ma JF. Effective reduction of cadmium accumulation in rice grain by expressing OsHMA3 under the control of the OsHMA2 promoter. *J Exp Bot*. 2018;69(10):2743-2752. doi:10.1093/jxb/ery107
128. Lv M, Liu Y, Geng J, Kou X, Xin Z, Yang D. Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection. *Biosens Bioelectron*. 2018;106(January):122-128. doi:10.1016/j.bios.2018.01.049
129. Gräwe A, Dreyer A, Vornholt T, et al. A paper-based, cell-free biosensor system for the detection of heavy metals and date rape drugs. *PLoS One*. 2019;14(3):1-22. doi:10.1371/journal.pone.0210940
130. Hashemi Goradel N, Mirzaei H, Sahebkar A, et al. Biosensors for the Detection of Environmental and Urban Pollutions. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):207-212. doi:10.1002/jcb.26030
131. Rim T. *Biosensors Based on Nanomaterials and Nanodevices [Book Review]*. Vol 8.; 2014. doi:10.1109/MNANO.2014.2327253

132. A. J. Bard, L. R. Faulkner, E. Swain and CR. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. (Pandey BDMCM, ed.). United Kingdom: A Smithers Group Company Shawbury,; 2017.
133. Alhadrami HA. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018;65(3):497-508. doi:10.1002/bab.1621
134. Vinet L, Zhedanov A. *Chemical Sensors and Biosensors*. Vol 44.; 2011. doi:10.1088/1751-8113/44/8/085201
135. Li M, Gou H, Al-Ogaidi I, Wu N. Nanostructured sensors for detection of heavy metals: A review. *ACS Sustain Chem Eng*. 2013;1(7):713-723. doi:10.1021/sc400019a
136. Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*. 2003;160(5):629-633. doi:10.1083/jcb.200210140
137. Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Iqbal HMN, Li C, Zhou Y. Fluorescent sensor based models for the detection of environmentally-related toxic heavy metals. *Sci Total Environ*. 2018;615:476-485. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.126
138. Wu D, Chen L, Xu Q, Chen X, Yoon J. Design principles, sensing mechanisms, and applications of highly specific fluorescent probes for HOCl/OCl⁻. *Acc Chem Res*. 2019;52(8):2158-2168. doi:10.1021/acs.accounts.9b00307
139. Belén D, Ec C. Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama. *Agrociencia Uruguay*. 2018;22(1):13-25. doi:10.31285/agro.22.1.2
140. Alberto Tárraga Tomás. *Sensores Moleculares: Un Reto Para El Químico, Una Demanda Social*. (Murcia A de C de la R de, ed.); 2012.
141. Meng X-M, Wang S-X, Zhu M-Z. Quinoline-based Fluorescence Sensors. *Intech open*. 2018;2:64. doi:10.5772/32009
142. Li J, Yin C, Huo F. Development of fluorescent zinc chemosensors based on various fluorophores and their applications in zinc recognition. *Dye Pigment*. 2016;131:100-133. doi:10.1016/j.dyepig.2016.03.043
143. Kostova I, Ojala T, Lacy A, et al. Natural Product Chemistry For Drug Discovery. *J Nat Prod*. 2010;5(8):440. doi:10.1021/np800144q
144. Liu X, Zhang N, Zhou J, Chang T, Fang C, Shangguan D. A turn-on fluorescent sensor for zinc and cadmium ions based on perylene tetracarboxylic diimide. *Analyst*. 2013;138(3):901-906. doi:10.1039/c2an36203a
145. de Silva AP, Moody TS, Wright GD. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst*. 2009;134(12):2385. doi:10.1039/b912527m
146. Li L, Guan R, Guo M, Ning P, Shao R, Meng X. A FRET based two-photon fluorescent probe for ratiometric detection of Pd²⁺ in living cells and in vivo. *Sensors Actuators, B Chem*. 2018;254:949-955. doi:10.1016/j.snb.2017.07.157
147. Krishnaveni K, Iniya M, Jeyanthi D, Siva A, Chellappa D. A new multifunctional benzimidazole tagged coumarin as ratiometric fluorophore for the detection of Cd²⁺/F⁻ ions and imaging in live cells. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;205:557-567. doi:10.1016/j.saa.2018.07.075
148. Kundu M, Krishnan P, Kotnala RK, Sumana G. Recent developments in biosensors to combat agricultural challenges and their future prospects. *Trends Food Sci Technol*. 2019;88(March):157-178. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.024

149. Kim HN, Ren WX, Kim JS, Yoon J. Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem Soc Rev.* 2012;41(8):3210-3244. doi:10.1039/c1cs15245a
150. He W, Luo L, Liu Q, Chen Z. Colorimetric Sensor Array for Discrimination of Heavy Metal Ions in Aqueous Solution Based on Three Kinds of Thiols as Receptors. *Anal Chem.* 2018;90(7):4770-4775. doi:10.1021/acs.analchem.8b00076
151. Ravindran A, Mani V, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Selective colorimetric sensing of cysteine in aqueous solutions using silver nanoparticles in the presence of Cr³⁺. *Talanta.* 2011;85(1):533-540. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.031
152. Kim HN, Ren WX, Kim JS, Yoon J. Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem Soc Rev.* 2012;41(8):3210-3244. doi:10.1039/c1cs15245a
153. Lee MH, Wu JS, Lee JW, Jung JH, Kim JS. Highly sensitive and selective chemosensor for Hg²⁺ based on the rhodamine fluorophore. *Org Lett.* 2007;9(13):2501-2504. doi:10.1021/ol0708931
154. Leung A, Shankar PM, Mutharasan R. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* 2007;125(2):688-703. doi:10.1016/j.snb.2007.03.010
155. Hassoon S, Schechter I. In situ fluorimetric determination of pesticides on vegetables. *Anal Chim Acta.* 2000;405(1-2):9-15. doi:10.1016/S0003-2670(99)00747-3
156. Valeur B. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications.* Vol 8. Wiley-VCH. Federal Republic of Germany; 2001. doi:10.1002/3527600248
157. Durrieu C, Tran-Minh C. Optical Algal Biosensor using Alkaline Phosphatase for Determination of Heavy Metals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002;51(3):206-209. doi:10.1006/eesa.2001.2140
158. De Silva AP, Moody TS, Wright GD. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst.* 2009;134(12):2385-2393. doi:10.1039/b912527m
159. Shi DT, Zhang B, Yang YX, et al. Bis-triazolyl indoleamines as unique “off-approach-on” chemosensors for copper and fluorine. *Analyst.* 2013;138(10):2808-2811. doi:10.1039/c3an00030c
160. Adhikari S, Ta S, Ghosh A, et al. A 1,8 naphthalimide anchor rhodamine B based FRET probe for ratiometric detection of Cr³⁺-ion in living cells. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2019;372(December 2018):49-58. doi:10.1016/j.jphotochem.2018.12.010
161. Kassal P, Steinberg MD, Steinberg IM. Wireless chemical sensors and biosensors: A review. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;266:228-245. doi:10.1016/j.snb.2018.03.074
162. Gunnlaugsson T, Lee TC, Parkesh R. Cd (II) Sensing in Water Using Novel Aromatic Iminodiacetate Based Fluorescent Chemosensors. 2003;(li).
163. Zhang Z, Wang C, Zhang Z, Luo Y, Sun S, Zhang G. Cd(II) enhanced fluorescence and Zn(II) quenched fluorescence with phenylenevinylene terpyridine: A theoretical investigation. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;209:40-48. doi:10.1016/j.saa.2018.10.022
164. Sun ZG, Li Z, Yuan DD, et al. A quinoline-based ratiometric and reversible fluorescent probe for cadmium imaging in living cells. *Chem Pharm Bull.* 2016;64(1):27-33. doi:10.1248/cpb.c15-00579
165. Xin L, Chen Y, Niu L, et al. A selective turn-on fluorescent probe for Cd²⁺ based on a boron difluoride β-dibenzoyl dye and its application in living cells. 2013:3014-3019. doi:10.1039/c3ob40376a
166. Duan N, Wang H, Li Y, Yang S, Tian H, Sun B. The research progress of organic fluorescent probe applied in food and drinking water detection. *Coord Chem Rev.* 2021;427:213557. doi:10.1016/j.ccr.2020.213557

167. Xu M, Ma R, Huang C, Shi G, Zhou T, Deng J. Competitive redox reaction of Au-NCs/MnO₂ nanocomposite: Toward colorimetric and fluorometric detection of acid phosphatase as an indicator of soil cadmium contamination. *Anal Chim Acta*. 2020;1096:174-183. doi:10.1016/j.aca.2019.10.062
168. Gorbatov SA, Kozlov MA, Zlobin IE, Kartashov A V., Zavarzin I V., Volkova YA. Highly selective BODIPY-based fluorescent probe for Zn²⁺ imaging in plant roots. *Mendeleev Commun*. 2018;28(6):615-617. doi:10.1016/j.mencom.2018.11.017
169. Wang H, Da L, Yang L, et al. Colorimetric fluorescent paper strip with smartphone platform for quantitative detection of cadmium ions in real samples. *J Hazard Mater*. 2020;392(January):122506. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122506
170. Li M, Lv HS, Luo JZ, Miao JY, Zhao BX. An effective "turn-on" rhodamine-based fluorescent chemosensor for Cu (II) in living cells. *Sensors Actuators, B Chem*. 2013;188:1235-1240. doi:10.1016/j.snb.2013.08.030
171. Saravana K, Rajamanikandan R, Ilanchelian M. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Smart phone assisted quinoline-hemicyanine based fluorescent probe for the selective detection of glutathione and the application in living cells. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2020;243:118809. doi:10.1016/j.saa.2020.118809
172. Yu Y, Wang J, Xiang H, et al. Dyes and Pigments A new near-infrared ratiometric fluorescent probe based on quinoline-fused rhodamine dye for sensitive detection of cysteine and homocysteine in mitochondria. *Dye Pigment*. 2020;183(April):108710. doi:10.1016/j.dyepig.2020.108710
173. Xue L, Li G, Liu Q, et al. Ratiometric Fluorescent Sensor Based on Inhibition of Resonance for Detection of Cadmium in Aqueous Solution and Living Cells. 2011:3680-3690.
174. Luo A, Gong Y, Yuan Y, Zhang J, Zhang C. Talanta A simple and pH-independent and ultrasensitive fluorescent probe for the rapid detection of Hg²⁺. *Talanta*. 2013;117:326-332. doi:10.1016/j.talanta.2013.09.033
175. Mironenko AY, Tutov M V., Sergeev AA, Voznesenskiy, Bratskaya SY. On/off rhodamine based fluorescent probe for detection of Au and Pd in aqueous solutions. *Sensors Actuators, B Chem*. 2017;246:389-394. doi:10.1016/j.snb.2017.02.092
176. Janczak J. Coordination properties of diethylenetriamine in relation to zinc phthalocyanine. *Polyhedron*. 2020;178:114313. doi:10.1016/j.poly.2019.114313
177. Geng T, Huang R, Wu D. Turn-on fluorogenic and chromogenic detection of Fe³⁺ and Cr³⁺ in a completely water medium with polyacrylamide covalently bonding to rhodamine B using diethylenetriamine as a linker. *RSC Adv*. 2014;4(86):46332-46339. doi:10.1039/c4ra08640f
178. Shiraishi Y, Ichimura C, Hirai T. A quinoline – polyamine conjugate as a fluorescent chemosensor for quantitative detection of Zn (II) in water. 2007;48:7769-7773. doi:10.1016/j.tetlet.2007.09.032
179. Saga M, Sakane G, Yamazaki S, Saito K. Inorganica Chimica Acta Fluorescent ligand design for mononuclear copper (I) complex fluorescence in aqueous solution. *Inorganica Chim Acta*. 2020;502(September 2019):119368. doi:10.1016/j.ica.2019.119368
180. García R. Determinación del rendimiento cuántico y tiempos de vida media de fluorescencia en sustancias colorantes con aplicaciones como fuentes láser. 2011.
181. Francisca Y, Small DM, Morrison PD, Spencer MJS, Ball AS, Jones OAH. Assessment of arsenic in Australian grown and imported rice varieties on sale in Australia and potential links with irrigation practices and soil geochemistry. *Chemosphere*. 2015;138:1008-1013. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.12.048

182. Ata-Ul-Karim ST, Cang L, Wang Y, Zhou D. Effects of soil properties, nitrogen application, plant phenology, and their interactions on plant uptake of cadmium in wheat. *J Hazard Mater.* 2020;384(August 2019):121452. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121452
183. Reis JCR, Lampreia IMS, Santos ÂFS, Moita MLCJ, Douh ret G. Refractive Index of Liquid Mixtures: Theory and Experiment. *ChemPhysChem.* 2010;11(17):3722-3733. doi:10.1002/cphc.201000566
184. Demchenko AP. *Introduction to Fluorescence Sensing Introduction to Fluorescence Sensing.*; 2015. doi:10.1007/978-1-4020-9003-5
185. Yang Y, Cheng T, Zhu W, Xu Y, Qian X. Highly selective and sensitive near-infrared fluorescent sensors for cadmium in aqueous solution. *Org Lett.* 2011;13(2):264-267. doi:10.1021/ol102692p
186. Li K, Cao C, Ma Y, Su D, Li J. Identification of cadmium bioaccumulation in rice (*Oryza sativa* L.) by the soil-plant transfer model and species sensitivity distribution. *Sci Total Environ.* 2019;692:1022-1028. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.091
187. R mkens PFAM, Guo HY, Chu CL, Liu TS, Chiang CF, Koopmans GF. Prediction of Cadmium uptake by brown rice and derivation of soil-plant transfer models to improve soil protection guidelines. *Environ Pollut.* 2009;157(8-9):2435-2444. doi:10.1016/j.envpol.2009.03.009