

Hidrocarburos Aromaticos y Fenilpropanoides

Presentes en la Rizosfera de Plantas de *Cyperus laxus* Crecido en Suelos Contaminados con Hidrocarburos

Araceli Rivera Casado Noemí *

Refugio Rodríguez Vázquez *

María del Carmen Montes Horcasitas *

Josefina Pérez Vargas **

Octavio Gómez Guzmán *

Graciano Calva Calva *

Resumen

En este trabajo se evaluó el perfil de compuestos fenólicos y de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) presentes en un sistema experimental para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, mediante el cultivo de *Cyperus laxus*, especie pionera en sitios de Tabasco contaminados por derrames de petróleo crudo. En el perfil cromatográfico por HPLC/UV de los suelos contaminados no cultivados, se destaca la presencia de compuestos conjugados del fluoreno (FL), acenafteno (ACNF), quercetina (QTN), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (HMBOH), quercetrina (QTRN) y ácido 3,4-dimetoxibenzóico (DMBA). En forma libre se detectó la presencia principalmente de antraceno (ANT), naftaleno (NAF), y acenaftileno (ANFTY), la cual fue generalizada en todos los suelos a un tiempo de retención similar al del estándar.

Por otro lado, en los suelos cultivados el perfil de PAH mostró la presencia de ANT y fenantreno (FNN). A dife-

rencia del perfil de fenoles de los suelos S163, SSR y S205, en los suelos cultivados se identificó una mayor variedad de compuestos estructuralmente similares a los PAH, dentro de los cuales destaca el naftaleno (NAF), criseno (CRI), ACNF, Benzo[b]Fluoranteno (BfF) y Fluoranteno (FLT). En los extractos de raíces, se detectó principalmente el ANT.

En el bulbo de las plantas los PAH detectados fueron ACNF y FNN. También se identificaron agregados con estructuras similares a FL, Indeno[1,2,3-c,d]Pireno (i123P), BaA, FLT y ACNF. Este último se detectó en todos los bulbos de plantas cultivadas en suelos contaminados. En el bulbo se encontraron además cantidades importantes de fenoles pertenecientes al grupo de los ácidos benzóicos, cinámicos, flavonas y flavonoles. En los extractos de hoja se identificó la presencia de ACNF y FLT y de compuestos estructuralmente similares a FNN y ANT. Dentro de los fenilpropanoides destacaron los compuestos pertenecientes al grupo de los ácidos benzóicos, flavonas y flavonoles tales como ácido protocatecólico, alcohol coniferílico, crisina, p-hidroxibenzóico, quercetina y luteína.

Acerca de los autores...

* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN)

** Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.



Introducción

Las plantas poseen tal diversidad metabólica que les permite acumular y/o degradar compuestos xenobióticos. Esta versatilidad metabólica vegetal, en conjunto con la de los microorganismos de la rizósfera, ha permitido su uso para la recuperación ecológica de sitios impactados por contaminantes, tecnología denominada fitorremediación, una de las tecnologías de biorremediación más eficientes, viables y económicas. Aunque ésta se ha aplicado por varios años, se conoce poco acerca de la interacción bioquímica entre los componentes ecológicos del sitio, especialmente a nivel del organismo responsable de las actividades enzimáticas y origen de los metabolitos formados durante el proceso de remoción. Por ello, en este trabajo se evalúa el perfil de los compuestos fenólicos derivados del metabolismo de fenilpropanoides y de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) presentes en un sistema experimental para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, mediante el cultivo de *Cyperus esculentus* y *Cyperus laxus*, especies pioneras en sitios de Tabasco contaminados por derrames de petróleo crudo.

En estudios previos, se encontró que un cultivo mixto de estos *Cyperus* participan en la degradación de esos hidrocarburos, removiendo hasta el 92% de estos compuestos, a partir de suelos con más de 300 g de hidrocarburos totales por kilogramo de suelo (Palma-Cruz, en trámite). Así, este sistema representa un modelo experimental único para el estudio de bioquímica involucrada durante el proceso de remoción, específicamente los PAH que abundan en esos suelos intemperizados. Aunque el objetivo final del proyecto es evidenciar algunas de las estrategias fisicoquímicas y fisiológicas que utilizan las plantas y microorganismos durante el proceso, en este trabajo se presenta el perfil de compuestos fenólicos y PAH presentes en el sistema cultivado con *Cyperus laxus*.

Materiales y métodos

Se colectaron plantas completas de *Cyperus* spp crecidas en macetas con suelo de pozos P163, P250, batería San Ramón y suelo de jardín como control, todas ellas provenientes del estado del Tabasco, cuya germinación y crecimiento se llevó a cabo en invernadero por más de tres años. La extracción de PAH se realizó de acuerdo con el método 3550B de la US EPA y el análisis e identificación se realizó por HPLC, utilizando en una columna PRODIGY ODS2 fase reversa (C18, 25 cm x 4.6 mm; 5µm; HPLC UV-visible Thermo Separation). La elución fue desarrollada usando como solvente A TFA 50µM y como solvente B Acetonitrilo HPLC con el siguiente gradiente: de 0-5 min A 10%, B 90%; de 5 a 25 min



A 20%, B 80%; de 25 a 45 min A 65%, B 35%; de 45 a 60 min A 80%, B 20%; de 60 a 70 min A 95%, B 5%; y de 70 a 85 min A 10%, B 90%. Se emplearon compuestos estándar de PAH (SUPELCO No. 48905-U). Se usó el método reportado por Martínez-Juárez (2004) para la determinación de compuestos fenólicos. Los límites de detección mínimo y máximo fueron 5 μM y 80 μM respectivamente, tanto para fenoles como para los PAH.

Las especies vegetales fueron seleccionadas con base en su presencia y prevalencia en las macetas. El género y especie fue *Cyperus laxus* y se identificaron dos poblaciones (I y II), las cuales se diferencian en la estructura de su inflorescencia. En MA y M17 se desarrolló *Cyperus laxus* perteneciente a la población I, mientras que en M10 estuvieron ambas poblaciones. Para el análisis en las muestras de suelo y tejido vegetal, de manera general, la cantidad de biomasa en peso seco fue de 80-90 mg para la determinación de fenoles y de 250 mg para la determinación de PAH.

Resultados y discusión

Tiempo de retención y longitud de onda para compuestos estándar usados para el análisis HPLC/UV

El método de HPLC desarrollado, permitió la separación concomitante de compuestos muy polares como la fenilalanina y vainillilamina entre los 2-6 minutos, los fenilpropanoides y derivados del ácido benzoico entre los 5-20 minutos, las flavonoides y flavonoles entre los 18 a los 35 minutos, y compuestos no polares como los hidrocarburos aromáticos de 1-5 o más anillos entre los 25 a 70 minutos (Figura 1). Los tiempos de retención y longitud de onda de máxima absorción usados para la integración de los picos respectivos, se muestran en la Tabla I.

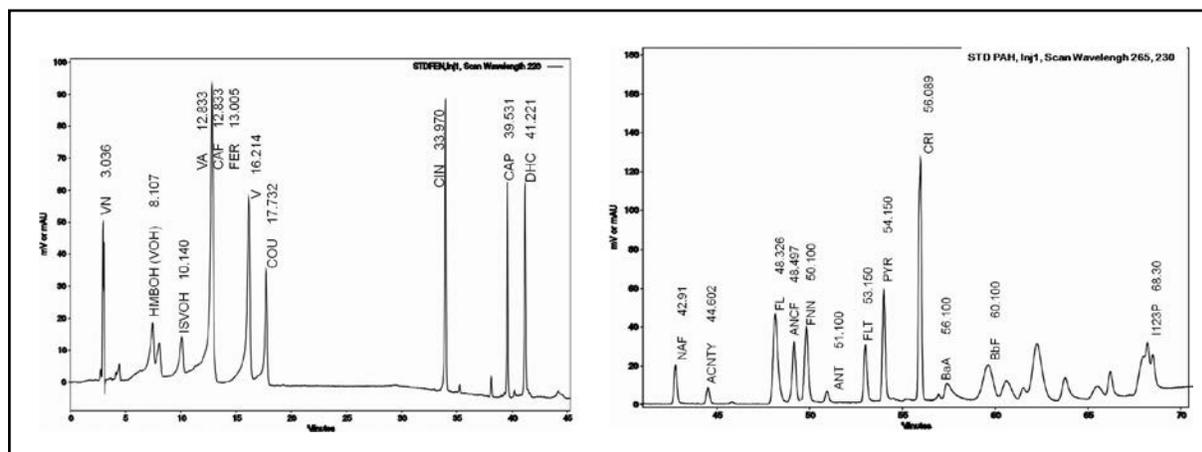


Figura 1. Cromatograma de la mezcla de fenoles (A) y de PAH (B) en HPLC con el gradiente de TFA:Acetonitrilo

Tabla 1. Tiempo de retención y longitud de onda usada para la determinación de fenoles y PAH

Tipo PAH	Abreviatura	[μ M]	Tiempo de retención (min.)	Alectura (nm)
Vainillinamina	VN	50.00	3.036	220 ^(*)
Alcohol vainillínico	VOH,HMBOH	50.00	8.107	220 ^(*)
Alcohol isovainillínico	ISVOH	50.00	10.140	220 ^(*)
Ácido vainillínico	VA	50.00	12.833	220 ^(*)
Ácido caféico	CAF	50.00	12.833	220 ^(*)
Ácido ferúlico	FER	50.00	13.005	220 ^(*)
Vainillina	V	50.00	16.214	220 ^(*)
Ácido coumárico	COU	50.00	17.732	220 ^(*)
Ácido cinámico	CIN	50.00	33.970	220 ^(*)
Capsaicina	CAP	50.00	39.531	220 ^(*)
Dihidrocapsaicina	DHC	50.00	41.221	220 ^(*)
Naftaleno	NAF	60.43	42.911	220
Acenaftileno	ANFTY	51.05	44.602	230
Fluoreno	FL	46.65	48.326	265
Acenafteno	ACNF	49.92	48.497	230
Fenantreno	FNN	46.65	50.100	250
Antraceno	ANT	44.154	51.100	250
Fluoranteno	FLT	38.12	53.150	230
Pireno	PYR	37.98	54.150	240
Criseno	CRI	34.15	56.089	265
Benzo[a]Antraceno	BaA	33.92	56.100	290
Benzo[b]Fluoranteno	BbF	30.55	60.100	260
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	i123P	27.95	68.300	250

(*) De acuerdo con lo reportado por Waldron et al., 1996

Selección de las especies vegetales

Dado que los suelos del PSR y P205 presentan mayor concentración de hidrocarburos totales, según lo reportado por Palma-Cruz (2008), se decidió coleccionar las especies vegetales de interés de las macetas M17 y M10 conteniendo dichos suelos, y como suelo control el MA proveniente de un jardín aledaño al área contaminada.

Las macetas M17 y M10 presentaron diferencias en cuanto a la cobertura y la diversidad de especies vegetales. Sin embargo, las diferencias fueron más notorias para M10, donde *Cyperus* spp logró abarcar aproximadamente el 95% del área superficial de la maceta, mientras que en M17 las plantas cubrieron sólo el 50% (Figura 2).

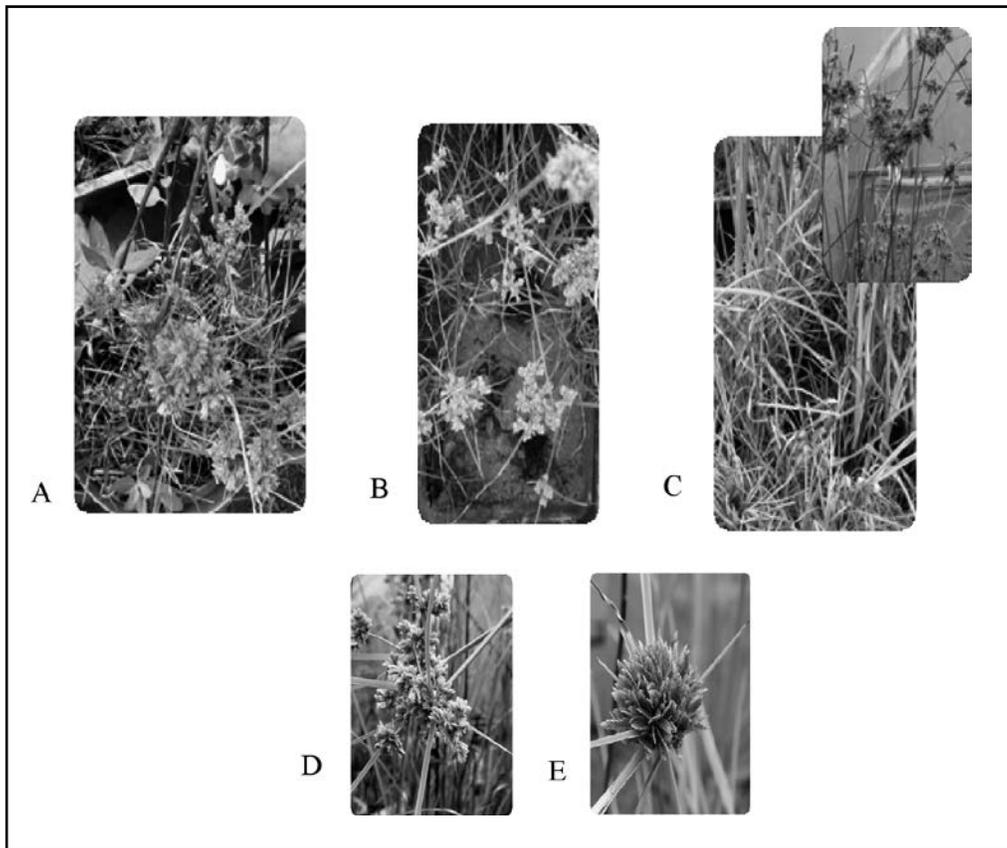


Figura 2. Maceta MA sembrada con *Cyperus laxus* pl en suelo de jardín cercano a los pozos (A); Maceta M17 sembrada con *Cyperus laxus* pl en suelo de PSR (B); Maceta M10 sembrada con *Cyperus laxus* pl y *Cyperus laxus* plI en suelo de P205 (C); *Cyperus laxus* población I (D); *Cyperus laxus* población II (E)

Perfil de fenoles e hidrocarburos aromáticos

Debido a la complejidad del sistema ecológico bajo estudio, se decidió establecer las diferencias entre la distribución de los compuestos fenólicos y PAH, tanto en suelo como en rizósfera, así como el perfil de dichos compuestos en los tres órganos elementales de *Cyperus* spp: raíz, hoja y el bulbo (Figura 3). Este último, es el conjunto de tejidos que participan en el almacenamiento de nutrientes y se encuentra dividiendo la parte aérea del tejido radical de este tipo de plantas.

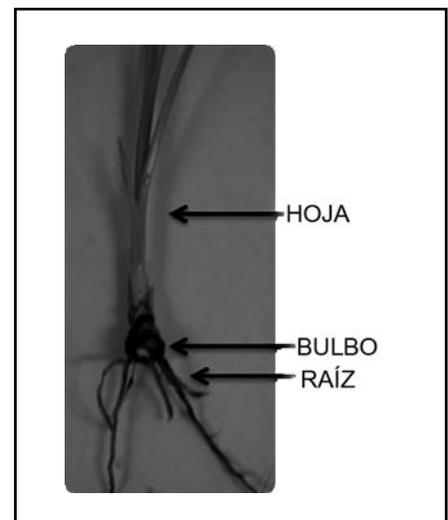


Figura 3. Órganos elementales de *Cyperus laxus*

En el perfil cromatográfico de PAH de los suelos I63, SSR y S205, se destaca la presencia de FL (Figuras 4A, 3, 5) con un porcentaje de correlación espectral del 73% respecto al estándar y un tiempo de retención menor en aproximadamente 10 minutos, lo que sugiere una modificación en la estructura del FL, debido a su conjugación con otros compuestos más polares. Este compuesto se detectó en mayor cantidad en el SSR que en S163 y S205. Por otro lado, se detectó ACNF (Figuras 4A, 6) únicamente en S163, pero con menor tiempo de retención y correlación (70%) espectral. En ese mismo suelo, un compuesto con espectro semejante en un 85% al NAF (Figuras 4A, 9) se manifestó en el minuto 79.23, lo que podría indicar una conjugación con compuestos que le confieren características no polares. Otro PAH detectado fue ANT al mismo tiempo de elución que el estándar (Figuras 4A, 7), pero con correlación espectral de 98% en SSR y S205, siendo mayor en el primero.

En los mismos extractos de PAH se identificaron diversos fenoles y flavonoides, entre los que destacan QTN, HMBOH, QTRN y DMBA (Figuras 4A, 2, 4, 5, 9). De igual manera, en los extractos fenólicos se detectaron principalmente flavonoides (Figuras 5A, 3, 4, 6) con un 70 a 80% de correlación espectral con QTN, pero a diferentes tiempos de retención. Eso sugiere la presencia de este tipo de compuestos en forma libre y/o conjugada con compuestos polares para los que muestran tiempo de retención inferior a la aglicona, o con otros menos polares cuando los tiempos de retención son mayores. Cabe resaltar que los compuestos que comparten el núcleo aromático, como los flavonoides y flavonoides glicosilados, no son separados por la columna a un mismo tiempo, ya que esto se lleva a cabo de acuerdo con la polaridad. Por ello, un flavonoide glicosilado tendrá un tiempo más corto que uno esterificado a un compuesto menos polar. Así, el desplazamiento en el tiempo de retención, tanto de estos compuestos fenólicos como de PAH, pudiera deberse a conjugaciones o adiciones como glicosilaciones, esterificaciones, eterificaciones, entre otras.

Para S163 ($16\ 000 \pm 2\ 000$ ppm de THP's) se detectaron compuestos PAH de bajo peso molecular (Tabla 1), tales como ANT, NAF, ANFTY (Figuras 5A, 2, 5, 8) pero a tiempos de retención menores que los estándares, lo que sugiere que -tales compuestos pudieran estar conjugados, posiblemente glicosilados. La presencia de ANFTY (Figuras 5A, 8) fue generalizada en todos los suelos a un tiempo de retención semejante al estándar, sin embargo, su correlación espectral fue baja, lo que podría indicar una conjugación con compuestos que no alteran su actividad cromófora.

Por otro lado, la presencia de NAF y ANFTY (Figuras 5A, 5, 8) fue generalizada en todos los suelos. En el SSR se encontraron compuestos con espectro semejante al FLT, pero a tiempos de retención menores. En el S205, además se ubicó la presencia de un compuesto al minuto 40 con espectro similar al del BbF, lo que sugiere nuevamente que pudiera estar conjugado con una molécula más polar. Así, los picos identificados como 10, 11 y 12 de la Figura 5A, pueden tratarse de compuestos que conserven el mismo núcleo aromático que el NAF, FL, ACNF, pero que hayan sufrido modificaciones como esterificaciones o eterificaciones con compuestos menos polares, como grupos acilo u otros compuestos que no alteren las características cromóforas del núcleo aromático principal.

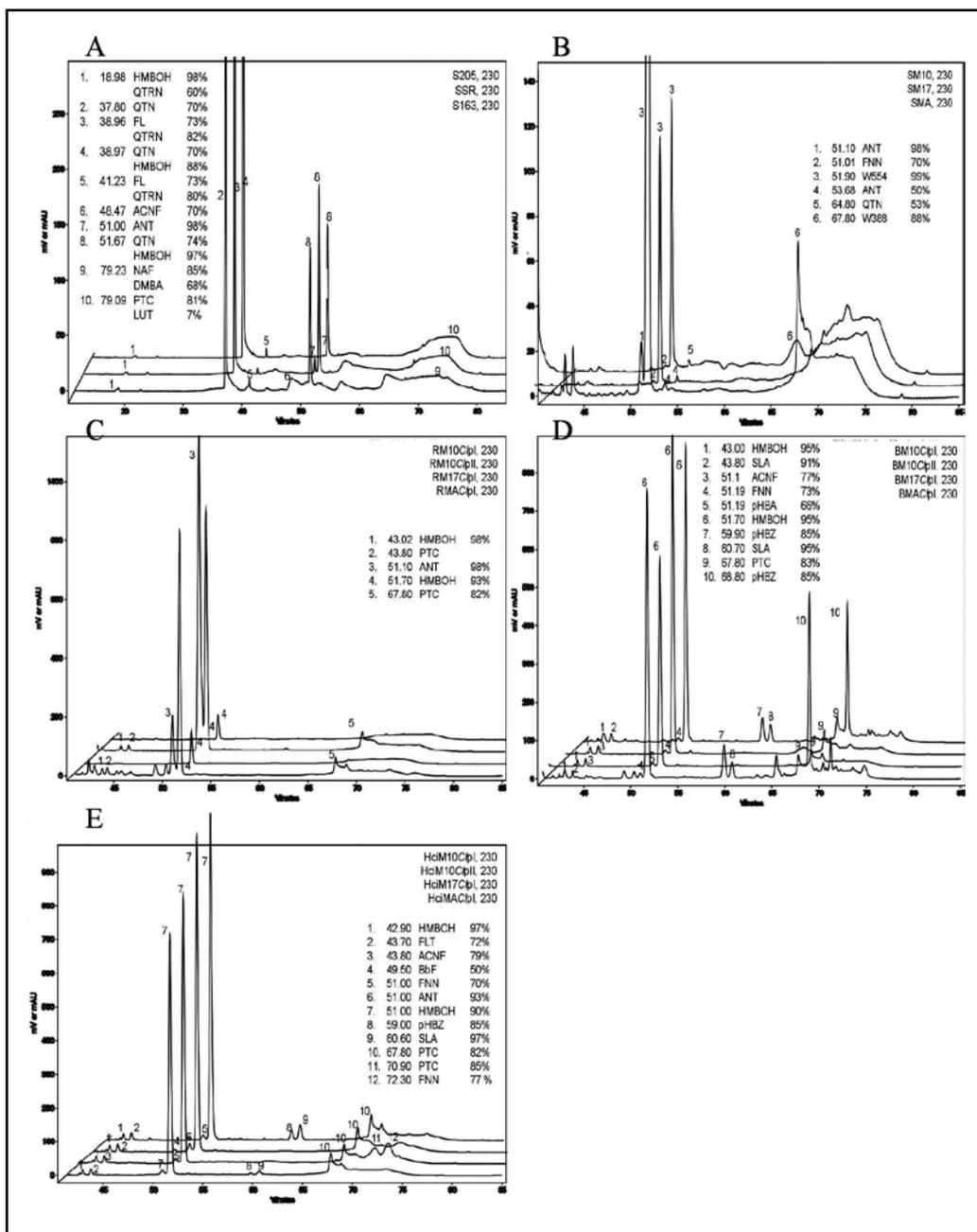


Figura 4. Perfil cromatográfico de los extractos de PAH a partir de suelos S163, PSR y S205 sin presencia de material vegetal (A); suelos de la maceta MA, M17 y M10 (B); Raíz de *Cyperus spp* sembrados en MA, M17 y M10 (C); Bulbo de *Cyperus spp* sembrado en MA, M17 y M10 (D); Hoja de *Cyperus spp* en MA, M17 y M10 (E). La leyenda de cada conjunto de cromatogramas indica el tipo de compuesto, su tiempo de elución y porcentaje de correlación respecto al espectro de absorción de los estándares; en el extremo superior derecho se indica el orden de aparición de los cromatogramas y su respectiva clave (R, raíz; M, maceta; Cl, *Cyperuslaxus*; pl, población i; pll, población II; ci, con in fluorescencia).

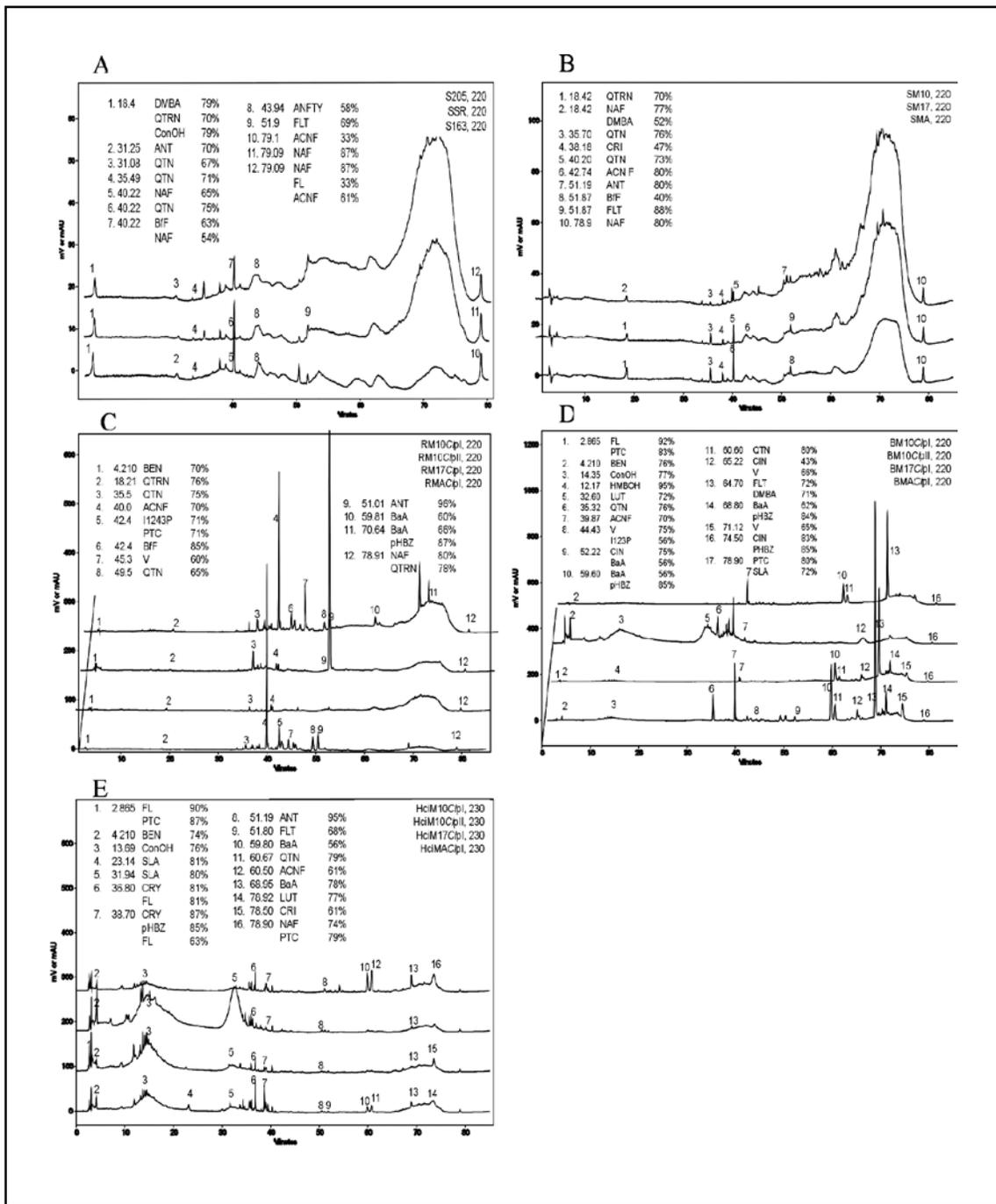


Figura 5. Perfil de fenoles en (A) suelo P163, PSR y P205; (B) suelos de la maceta MA, M17 y M10; (C) Raíz de *Cyperus* spp sembrados en MA, M17 y M10; (D) Bulbo de *Cyperus* spp sembrado en MA, M17 y M10; (E) Hoja de *Cyperus* spp en MA, M17 y M10. BEN, benceno; PTC, ácido protocatecico; HMBCH, alcohol vainillínico; pHBZ, para-hidroxibenzóico; pHBZ, para-hidroxibenzaldehído; ConOH, alcohol coniferílico; QTN, quercetina; QTRN, quercetrina; SLA, ácido salicílico; LUT, luteína; CRY, crisina.

De acuerdo con Robards (2003), los principales compuestos fenólicos de las plantas (Figura 6) se pueden clasificar en: flavonoles, ácidos cinámicos, coumarinas, antocianinas, ácidos benzoicos, flavones, y flavonones, entre otros. Todos esos compuestos son sintetizados vía shikimato como parte del metabolismo secundario. Algunos de estos fenilpropanoides son inducidos en respuesta al estrés, tal como exceso de luz, ataque de patógenos, cambios de temperatura, daño mecánico o deficiencia en nutrientes (Dixon et al., 1995).

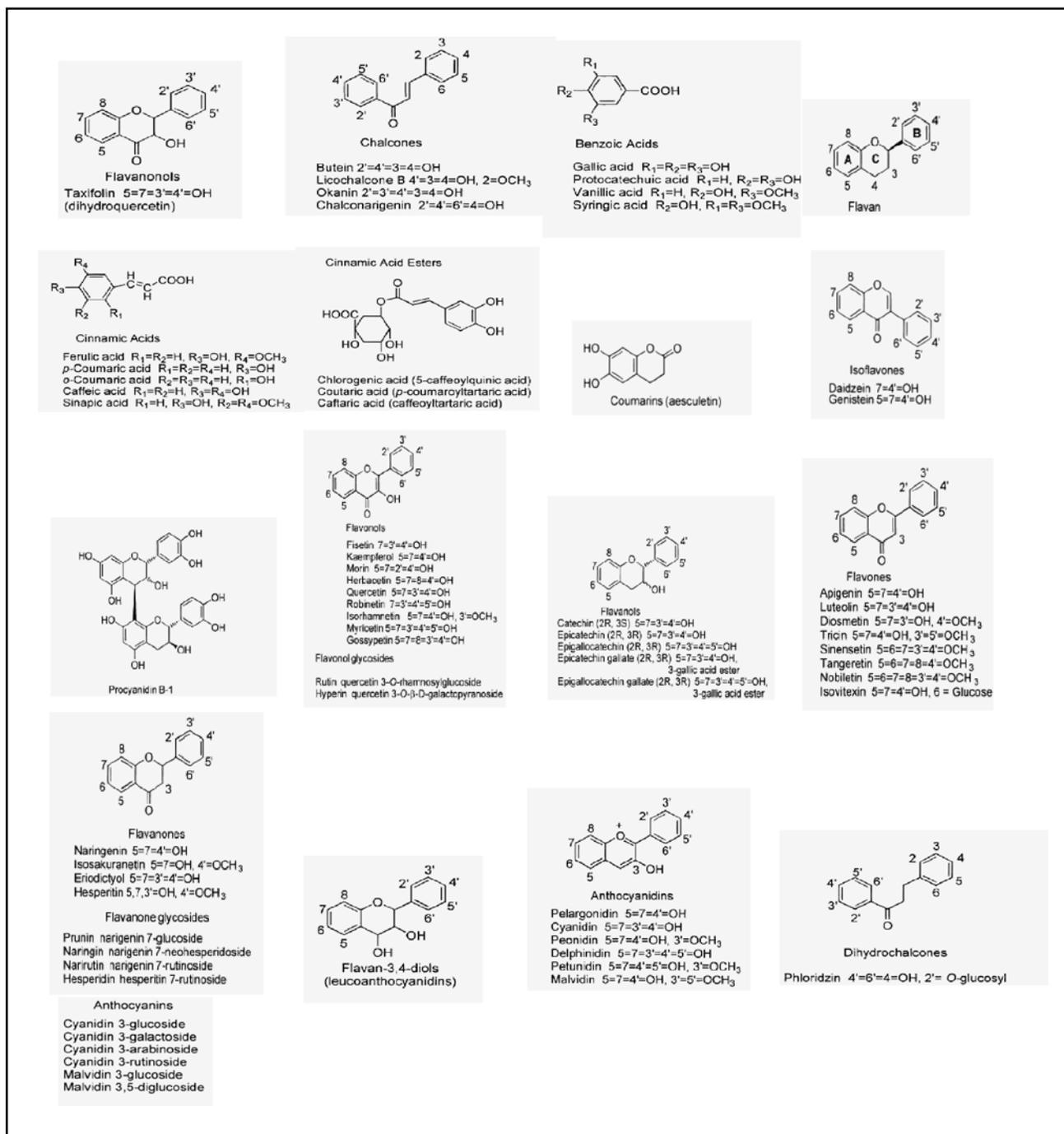


Figura 6. Principales compuestos fenólicos en plantas (Tomado de *Journal of Chromatography A*).

En el perfil de PAH de los suelos en donde hubo crecimiento de especies vegetales, se detectó la presencia de ANT y FNN (Figuras 4A, 1, 2) con un porcentaje de correlación espectral de 98% y 70%, respectivamente, lo que para el FNN indica una posible modificación en su estructura, aunque su núcleo aromático permanezca estable ya que su tiempo de retención no fue desplazado. Un compuesto con estructura cromófora parecida al ANT (Figuras 4A, 4) se encuentra presente en todos los suelos y aunque su tiempo de retención no fue modificado notablemente, la correlación espectral con el estándar es muy baja, lo que lleva a considerar el criterio establecido anteriormente. La elevada concentración de este último compuesto en el suelo de MA pudiera deberse a que, a pesar de que el suelo fue recolectado de un sitio no impactado directamente, se encuentre contaminado debido a las actividades antropogénicas y a los continuos cambios hidrológicos de la zona, que favorecen la dispersión de tales compuestos recalcitrantes en toda el área.

A diferencia del perfil de fenoles de los suelos S163, SSR y S205, para los suelos

de las macetas seleccionadas se identificó una mayor variedad de compuestos estructuralmente similares a PAH, tal es el caso de NAF, CRI, ACNF, BfF y FLT (Figura 5B), donde los primeros cuatro eluyen a un tiempo menor respecto a los estándares, lo que indica que las moléculas adquirieron características más polares, que pudiera deberse a su conjugación con compuestos que le confieren esta característica o por presentarse en forma libre. Por otro lado, el FLT (Figuras 5B, 9) se detectó a un tiempo de retención ligeramente menor que el identificado en el estándar, mientras que el NAF (Figura 5B 10) a un tiempo mucho mayor, lo que manifiesta una posible adición de grupos que le confieren características polares y no polares respectivamente, pero conservando el núcleo aromático característico. Dentro de los fenoles identificados, predomina la presencia de compuestos similares a la quercetina (QTN) con correlación espectral cercana al 75% (Figuras 5B, 3, 5), por lo que adquirió características ligeramente no polares debidas a su elución tardía.

Al inicio del desarrollo experimental, se esperaba encontrar una mayor concentración de PAH en los suelos SSR y S205, en comparación con los de las macetas seleccionadas, donde hubo crecimiento de materia vegetal. Sin embargo, los resultados demuestran que la degradación y/o transformación de estos compuestos a lo largo del tiempo después del derrame, se debe a la acción conjunta de las especies vegetales, microbianas y transformaciones fisicoquímicas que se llevan a cabo en el ecosistema, como fotooxidación, pirólisis y evaporación.

En cuanto al perfil de PAH en extractos de raíces, se detectó ANT (Figuras 4C, 3) con un 98% de correlación espectral en relación con su estándar, lo que aunado a que su tiempo de retención no fue modificado, se establece que dicho



compuesto aromático prácticamente no sufrió ninguna alteración. Este PAH estuvo presente tanto en *C. laxus pl* de MA y de *C. laxus pll* de M10 en concentraciones elevadas, dato que confirma el análisis del perfil de fenilpropanoides, donde el ANT se manifestó en cantidades elevadas en *C. laxus pl* de M10 (Figuras 5C, 9), mientras que el ACNF en cantidades similares tanto en *C. laxus pl* de MA como de M10 (Figuras 5C, 4).

Dentro de los compuestos fenólicos predominan flavonoles y ácidos benzóicos tales como QTN, QTRN, PTC, V y Phbz (Figuras 5C, 2, 3, 5, 11, 12) los cuales en su mayoría han adquirido comportamiento ligeramente no polar, debido a que sus tiempos de retención fueron mayores y la correlación espectral respecto a los estándares fue de aproximadamente 75%. De igual manera, podría sugerirse la participación de estos compuestos fenólicos como moléculas asociadas a los núcleos aromáticos de i123P, BfF, BaA, NAF y ACNF, otorgando principalmente características polares; tal es el caso del i123P, el cual tuvo un tiempo de retención de 42 minutos y correlación espectral del 70%; sin embargo, se identificó la presencia de otro compuesto al mismo tiempo de retención pero con correlación espectral del 70% respecto a PTC, lo cual podría sugerir la conjugación de este último con el PAH, pero manteniéndose intacto el grupo cromóforo del hidrocarburo aromático.

En el bulbo, los PAH detectados fueron ACNF (Figuras 4D, 3) en *C. laxus pl* de M17 y FNN (Figuras 4D, 4) en *C. laxus pl* de MA y M10 y *C. laxus pll* de M10. No obstante, en el perfil de fenilpropanoides se identificaron agregados con estructuras similares a estos compuestos recalcitrantes, tales como FL, i123P, BaA, FLT y ACNF (Figuras 5D, 1, 7, 8, 10, 13) estando este último presente en todos los bulbos, pero mayormente en *C. laxus pl* de MA y M10, con una correlación espectral del 70% y con tiempo de retención menor en 10 minutos respecto al estándar. Al igual que en las raíces, el i123P, BaA y FLT probablemente se encuentren asociados a compuestos fenólicos, que pudieran estar relacionados con los fenilpropanoides que se detectan al mismo tiempo de retención y con correlación espectral cercana al 70%. El caso del FL (Figuras 5D, 1) presente en *C. laxus pl* de M17, indica una posible modificación de su estructura con otros compuestos que incrementan su polaridad, pero se mantienen las características cromóforas de su núcleo.

Por otro lado, en el bulbo se encontraron cantidades importantes de fenoles pertenecientes al grupo de los ácidos benzóicos, cinámicos, flavonas y flavonoles. Este resultado es lógico, si se considera que el bulbo realiza un número importante de actividades metabólicas en la planta, debido a que es el punto central entre la raíz y la parte aérea, por ejemplo funciones de almacenamiento. No obstante, los compuestos con espectros similares al de los fenilpropanoides detectados en este órgano, probablemente se encuentren asociados a azúcares, debido a que su espectro de absorción (menor al 80% de correlación) y sus tiempos de retención fueron menores a los estándares.

En los extractos de PAH en hoja, se detectó la presencia de ACNF (Figuras 4E, 3) en *C. laxus pl* de M17, mientras que a ese mismo tiempo apareció FLT (Figuras 4E, 2) en el resto de las hojas analizadas. Compuestos estructuralmente similares a FNN y ANT (Figuras 4E, 5, 6) se presentaron en las hojas de *C. laxus pl* de M17 y M10; de BfF y ANT (Figuras 4E, 4, 6) en *C. laxus pll* de M10. Dentro de los

fenilpropanoides destacan compuestos pertenecientes al grupo de los ácidos benzóicos, flavonas y flavonoles, tales como ácido protocatecónico, alcohol coniferílico, crisina, p-hidroxibenzóico, quercetina y luteína (Figuras 5E, 1, 3, 6, 7, 11, 14) que presentan diversas modificaciones estructurales según lo establecido anteriormente, con base en su variación en el tiempo de elución y bajo porcentaje de correlación.

Finalmente, es en el suelo donde se llevan a cabo diversas interacciones planta-microorganismo-suelo, por lo que es considerado como una matriz compleja de compuestos. Partiendo de ello, es posible que las mesetas que se observan al final de los cromatogramas, alrededor del minuto 65 al 75, hayan sido resultado de una deficiente separación de los compuestos presentes, ya sea por la elevada cantidad, variedad y complejidad en su estructura.

Es interesante destacar que, de acuerdo con la información obtenida en este estudio, existe una mayor variedad de compuestos fenólicos estructuralmente similares a fenilpropanoides en *Cyperus laxus pl* respecto a *Cyperus laxus pll*, por lo que se podrían establecer diferencias metabólicas entre las dos poblaciones, lo cual posiblemente se encuentre relacionado con el potencial de remoción y la participación co-dominante de estas especies vegetales. Por ello, el análisis detallado del perfil metabólico de los órganos de estos *Cyperus*, en conjunto con el de *Cyperus esculentus* (especie dominante en esos sistemas), permitiría establecer un panorama general de los mecanismos de transformación, asimilación y/o detoxificación de los hidrocarburos poliaromáticos en este sistema.



Bibliografía...

Dixón R., Palva, N., 1995. "Stress-Induce Phenylpropanoid Metabolism". *The Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Martínez-Juárez, V. M.; N. Ochoa-Alejo, A. Ariza-Castolo, E. Lozoya-Gloria, F. J. Esparza-García, M. L. Villarreal-Ortega G. Calva-Calva, 2004. "Specific synthesis of 5, 5'-Dicapsaicin by cell suspension cultures of *Capsicum annum* var. *annuum* (Chili jalapeño chigol) and their soluble and NaCl-extracted cell wall protein fractions." *J. Agr. Food Chem.* 52:972-979.

Palma-Cruz, F., (en trámite). Ecología y fenología de especies vegetales encontradas en suelos de Tabasco crónicamente contaminados con hidrocarburos. Tesis, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Zacatenco, México, D.F., México.

Robards K., 2003. "Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables." *Journal of Chromatography A*, 1000, 657-691.

Waldron K.W., Parr, A. J., Ng, A., Ralph J., 1996. "Cell Wall Esterified Phenolic Dimers: Identification and Quantification by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography and Diode Array Detection." *Phytochemical Analysis*, 7, 305-312.