

Adsorción de iones cobre por una mezcla de oligogalacturónidos para su empleo en biorremediación

Omar Cartaya, Inés Reynaldo y Carlos. Peniche.*

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera Tapaste- San José kilómetro 3½, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Código Postal 32 800. Correo electrónico: ocartaya@inca.edu.cu. *Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana.

Recibido: 30 de abril de 2008. Aceptado: 14 de mayo de 2009.

Palabras clave: productos naturales, oligogalacturónidos, metal, biorremediación, tomate.
Key words: natural products, oligogalacturonides, metal, biorremediation, tomato.

RESUMEN. La mezcla de oligogalacturónidos (Ogal) se obtiene a partir de la corteza de los cítricos. Este producto presenta un grado de polimerización entre 7 y 16 y posee un grupo carboxílico terminal, que facilita la formación de enlaces con los metales pesados para formar complejos. En este trabajo se determinaron las constantes de estabilidad de los complejos formados entre la mezcla de Ogal y los iones cobre (II) por valoración potenciométrica, las que resultaron $18,5 \pm 0,2$ y $3,1 \pm 0,2$ respectivamente, las cuales evidenciaron que los complejos estudiados son estables. Los complejos formados se caracterizaron en fase sólida por espectroscopia IR y análisis térmico y se determinaron las principales afectaciones que tuvieron lugar en los grupos funcionales como resultado de la ionización y se pudo apreciar que los complejos resultan menos estables térmicamente que el Ogal de partida. Por otra parte, se realizaron ensayos para analizar la posibilidad de que esta mezcla de oligogalacturónidos pudiera proteger a plántulas de tomates variedad Amalia cultivadas bajo concentraciones tóxicas de ese metal. Se evaluó la masa fresca y seca foliar y radical, así como la longitud de la raíz y se observó un mayor crecimiento radical y una disminución de la altura de las plantas tratadas con el producto, efectos que contrarrestan el efecto de la toxicidad por iones Cu^{2+} . Se determinó el contenido de metales en esos órganos por adsorción atómica y se observó la existencia de un cambio en el patrón de acumulación de los metales en ellos.

ABSTRACT The mixture of oligogalacturonides (Ogal) from citric peel. This product presents a degree of polymerization between 7 and 16. Each galacturonic residue has a terminal carboxyl group allowing the formation of complex with heavy metals. In this work the stability constants of the formed complexes between the mixture of Ogal and the ion copper (II) were determined by potentiometric titration turning out of $18,5 \pm 0,2$ and $3,1 \pm 0,2$ respectively, being evidenced that the studied complexes are stable. The formed complexes were characterized in solid phase by IR- spectroscopy and thermal analysis, determining the main affectations in the unfunctional groups product of the ionization and it is appreciated that the complexes are less stable thermally than the departure Ogal. On the other hand were carried out rehearsals analyzing the possibility, that the mixture of oligogalacturonides could protect tomato seedlings variety Amalia growing with toxic levels of metal, being evaluated the fresh and dry mass foliate and radical as well as the longitude of the root, observed a bigger radical growth and a decrease of the height of the plants tried with this product, effects that counteract the effect of the toxicity for Cu^{2+} . The content of metals was determined in these organs by atomic adsorption, existing a change in the pattern of accumulation of the metals in these organs.

INTRODUCCIÓN

En el medio agrícola, en particular en el suelo, el contenido de metales pesados debería ser únicamente función de la composición del material original y de los procesos edafogenéticos que dan lugar al suelo. Pero la actividad humana incrementa el contenido de estos metales en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas. Ellos que pueden provenir de la aplicación sucesiva y masiva de los pesticidas y fertilizantes químicos, o del aprovechamiento de aguas residuales y residuos urbanos e industriales.¹

Dentro de la búsqueda de nuevos materiales con propiedades interesantes para varios aspectos de la ciencia y la tecnología, en los últimos años, se ha incrementado

el interés en la caracterización de las propiedades físicas y químicas de los polímeros naturales para su aplicación en la extracción, concentración y separación de iones de metales; principalmente, en las industrias que generan contaminantes de este tipo, en sus residuos líquidos.^{2,3} Estos polímeros se pueden obtener mediante procesos sencillos y no son dañinos al medio ambiente. Otra propiedad atractiva de los polímeros naturales es que poseen un gran número de grupos funcionales, lo que les permite extraer fácilmente al metal por adsorción química o física.⁴

El ácido poligalacturónico es un polisacárido gelificante que constituye un fragmento químicamente homogéneo de las pectinas; es un ácido úronico caracterizado por presentar un grupo carboxílico terminal capaz de enlazar la mayoría de los iones de metales de transición.⁵

Esta propiedad puede ser empleada para acomplejar iones de metales tóxicos como el cobre, el cual constituye una de las limitaciones más importantes de la producción en suelos ácidos. Estos suelos constituyen actualmente más del 30 % de los tipos de suelos a nivel mundial.⁶ El ácido galacturónico puede activar la solubilización de iones de metal a través de la formación de complejos, movilizándolos de sus sales insolubles. En este trabajo se evaluó la formación del complejo entre los oligogalacturónidos (Ogal) y los iones Cu^{2+} y la posible protección a plántulas de tomate crecidas en un medio con exceso de estos iones.

MATERIALES Y MÉTODOS

La mezcla de oligogalacturónidos (Ogal) se obtuvo en el INCA según la metodología de Cabrera.⁷ Las valoraciones potenciométricas se realizaron utilizando 0,2175 g de Ogal y 0,2283 g de ácido galacturónico comercial (Gal), se adicionaron 10 mL de $\text{CuCl}_2 \cdot 10^{-3}$ mol/L, cuya concentración fue determinada por valoración con EDTA; el volumen final fue de 100 mL. La disolución titrante fue NaOH 0,1 mol/L. Se midió el pH durante el transcurso de la valoración. Las mediciones se realizaron por triplicado a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Los complejos sólidos de Ogal y los iones Cu^{2+} se obtuvieron por agitación de Ogal con disolución de CuCl_2 . La disolución se agitó durante 1 h. El precipitado obtenido fue centrifugado y secado a 60°C . Después, fue caracterizado por espectroscopia FTIR y ATD.

Para estudiar el efecto de Ogal sobre las raíces de tomate, se utilizaron semillas de *Lycopersicon*

esculentum Mill. var. Amalia embebidas con Ogal a una concentración de 10, 20 y 30 mg/L durante cuatro horas. Las semillas se plantaron en recipientes plásticos en los que se utilizó arena sílice como soporte. Se emplearon ocho recipientes plásticos por cada tratamiento, con una planta por cada uno. El exceso de iones Cu^{2+} y los nutrientes se aplicaron mediante el suministro manual de disolución nutritiva de Hoagland.⁸

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1. Semillas embebidas en H_2O y crecidas con disolución nutritiva sin exceso iones Cu^{2+} .
- T2. Semillas embebidas en H_2O y crecidas con disolución nutritiva con exceso Cu^{2+} .
- T3. Semillas embebidas en Ogal 10 mg/L más disolución nutritiva con exceso de iones Cu^{2+} .
- T4. Semillas embebidas en Ogal 20 mg/L más disolución nutritiva con exceso de iones Cu^{2+} .
- T5. Semillas embebidas en Ogal 30 mg/L más disolución nutritiva con exceso de iones Cu^{2+} .

A los 28 d de germinadas las semillas, se evaluó la masa fresca y seca foliar y radical, así como el contenido de iones cobre en estos órganos por adsorción atómica.

Los resultados se analizaron por análisis de varianza de clasificación simple, en caso de diferencias significativas, las medias se compararon según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil de la valoración potenciométrica del ácido galacturónico y la mezcla de oligogalacturónidos en ausencia y presencia de iones Cu^{2+} (Fig. 1) muestran que

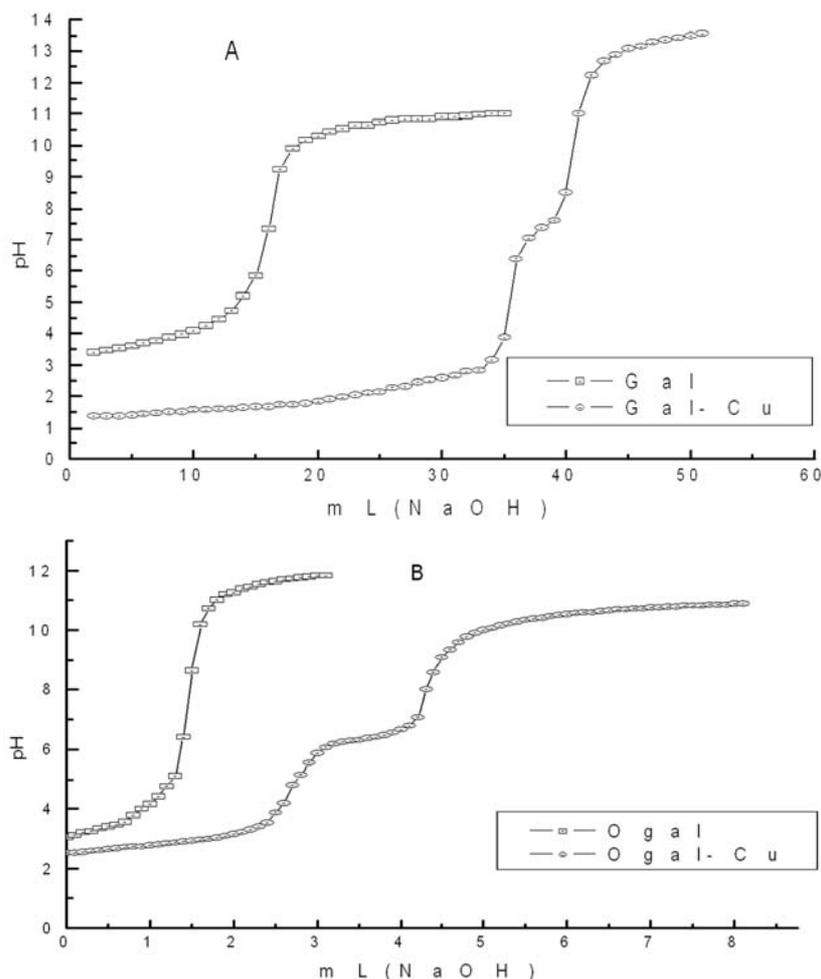
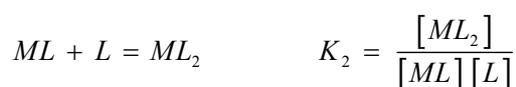


Fig. 1. Valoración potenciométrica de los Gal (A) y Ogal (B) con 0,1 mmol de Cu^{2+} .

la curva que corresponde al metal se encuentra situada debajo de la que corresponde a los oligogalacturónidos solamente en todos los casos y la diferencia de pH entre estas dos gráficas indica que la formación del complejo tiene lugar en la mayor parte de la zona de neutralización. La diferencia de pH, que se observa en las dos curvas para una misma cantidad de base añadida, señala la formación de un complejo.

La valoración potenciométrica permitió observar un proceso en el que el primer salto se corresponde con la neutralización de los protones carboxílicos, mientras que la segunda inflexión sugiere que más protones están relacionados con la formación de complejos, según los equilibrios que tienen lugar en la formación del complejo.^{9,10}

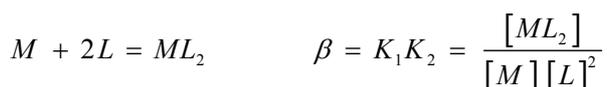


donde:

M ion Cu^{2+}

L Ogal.

La reacción total es:



Pero esto ocurre en una zona de pH donde la fase sólida está presente limitando el equilibrio, por lo que se trabajó en la zona de la curva que corresponde a la especie soluble.

Un examen de las curvas en la figura muestra que para el caso de los iones Cu^{2+} , se evidencia un primer salto a pH = 4 y otro a pH = 10 que deben estar relacionados con la formación del complejo Cu(II)-ácido galacturónico. En el transcurso de la valoración, se observó la formación de un precipitado de coloración azul alrededor de pH = 9, situación que hizo difícil el análisis del equilibrio por la presencia de la fase sólida

Todos los sistemas ácido galacturónico-ión metálico son marcadamente estables de acuerdo con sus cons-

tantes de estabilidad (Tabla 1). Estos resultados evidencian la mayor afinidad por los iones Cu^{2+} del Ogal.

Estas constantes de estabilidad están en el orden de lo reportado por Merce y cols.¹¹ los cuales estudiaron la formación de complejos en medio sólido y líquido de extractos de semillas de *C. Fastuosa* con elevado contenido de ácidos. Cescuti y Rizzo¹² analizaron la interacción de oligogalacturónidos de diferentes grados de polimerización con cationes de metales divalentes evidenciándose gran influencia del grado de polimerización en la formación de los complejos, así como en las determinaciones de la afinidad en el orden Cu, Ca, Zn.

Mediante los espectros IR de los complejos se conocieron las principales afectaciones en los grupos funcionales principales como resultado de la ionización (Fig. 2) Las vibraciones del enlace intermolecular del grupo O-H en los polisacáridos libres aparecen entre 3 500 y 3 200 cm^{-1} que luego de afectadas por la ionización, aparecen a 3 400 cm^{-1} con un hombro cercano a 2 900 cm^{-1} . Por otro lado, el acoplamiento vibracional en el anillo de los grupos COH, CH_2 y CCH aparecen a 1 400 cm^{-1} , esto puede ser provocado por la formación del complejo metálico, las vibraciones del C-O y del C-C se observan entre 1 400 y 990 cm^{-1} y también aparecen bandas mezcladas a 1 050 cm^{-1} por la formación del complejo.

Las curvas termogravimétricas (TG) del Ogal (Fig. 3) muestran un efecto térmico principal en el intervalo 195 – 306 °C con temperatura máxima de descomposición de 258 °C, producto de la deshidratación y descarboxilación del polímero. En el complejo Ogal-Cu (II) aparecen dos efectos: la primera degradación ocurre en el intervalo de 165 a 228 °C con temperatura máxima de descomposición de 210 °C seguida de un segundo proceso que presenta una máxima velocidad de descomposición a 250 °C, con una pérdida de masa asociada que casi duplica la del primer efecto. se pudo apreciar que el complejo re-

Tabla 1. Logaritmos de las constantes de estabilidad de los complejos del Gal y el Ogal con los iones Cu^{2+} a $T = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$ y $I = 0,1 \text{ mol/L}$ (KCl).

	Comercial	Ogal
$\text{c(ML)}/\text{c(M)c(L)}$	$15,4 \pm 0,5$	$18,5 \pm 0,2$
$\text{c(MHL)}/\text{c(ML)c(H)}$	$3,3 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,2$

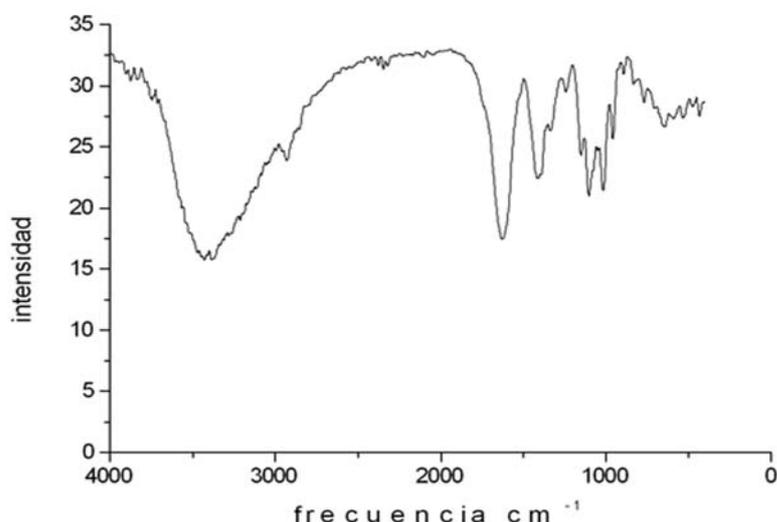


Fig. 2. Espectro infrarrojo del complejo Ogal-Cu (II).

Fig. 3. Curvas termogravimétricas de Ogal y del complejo Ogal- Cu (II).

sulta menos estable térmicamente que el Ogal de partida (Fig. 3). El efecto por debajo de 100 °C en todos los casos, se debe a la pérdida de agua presente en ellos.

Los resultados de la longitud de la raíz principal de plantas de tomate cv Amalia procedentes de semillas tratadas con disoluciones de 10, 20, 30 mg/L de oligogalacturónidos y luego plantadas en un sustrato al que se le añadió disolución nutritiva con exceso de iones Cu^{2+} , no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En general se distingue una tendencia a la disminución de la longitud radical de las plantas que crecieron en contacto con los iones Cu^{2+} . Sin embargo, entre ellas se puede apreciar que hubo mayor tendencia a la disminución de la longitud radical en las plantas que crecieron en contacto con los iones Cu^{2+} sin aplicación previa de Ogal, en relación con aquellas que sí recibieron tratamiento con el producto.

Este comportamiento sugiere que la dosis de 5 mg/L de iones Cu^{2+} resulta fitotóxica para las plantas de tomate del cultivar Amalia y que la aplicación de oligogalacturónidos en dosis de 10 mg/L y mayores parecen atenuar la toxicidad o al menos, estimula el alargamiento de la raíz principal.

Al evaluar las masas frescas y secas de las raíces de las plantas [Fig. 4 (A y B)]. Se observó que tanto una como otra disminuyen cuando las plantas se ponen a crecer en un medio que contiene exceso de iones Cu^{2+} .

En las plantas provenientes de semillas que fueron tratadas con oligogalacturónidos las masas de las raíces disminuyeron en la medida en que aumentaba la concentración del producto aplicado, de manera que la dosis intermedia de 20 mg/L provocó el mismo efecto que las otras dos.

Se pudo apreciar que la masa seca de las raíces de las plantas tratadas con iones Cu^{2+} (Fig. 5) presentó mayor afectación que la masa fresca (Fig. 4), lo que se deduce de la comparación con las plantas controles, ya que el porcentaje de reducción estuvo en el intervalo del 50 al 83,4 % y del 43,9 al 65 % para dichas masas respectivamente y los límites superiores correspondieron a las raíces de las plantas tratadas con la mayor dosis de oligogalacturónidos.

Conociendo que los metales pesados se acumulan en diferentes órganos de las plantas según sea la especie,¹³ se procedió a evaluar el contenido de Cu^{2+} en las raíces y las hojas de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en estudio (Fig. 6) y se pudo apreciar que en las

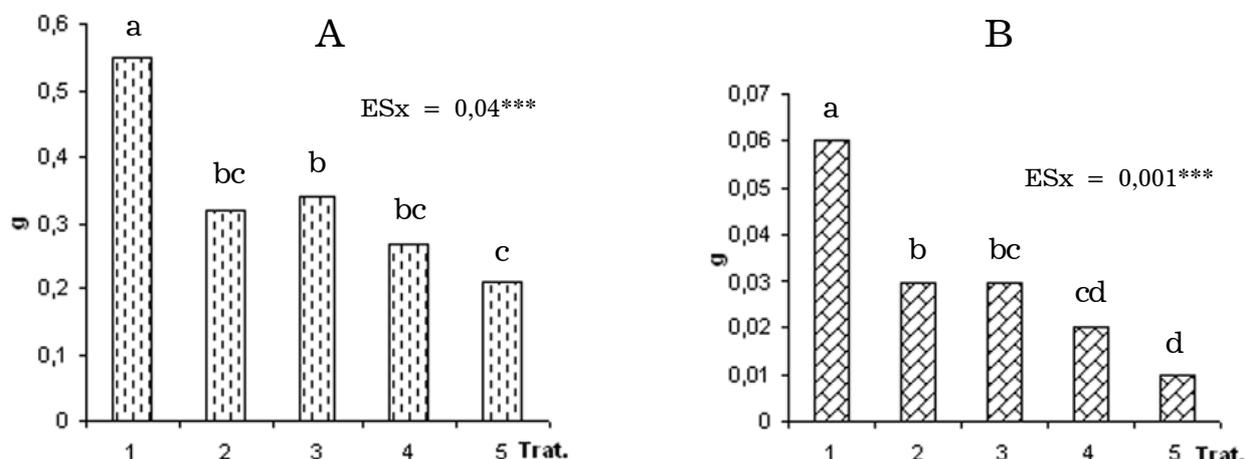


Fig. 4. Efecto de los oligogalacturónidos en la masa fresca (A) y seca (B) de plantas de tomate cv. Amalia crecidas con exceso de iones Cu^{2+} . Trat. Tratamientos.

plantas procedentes de los tratamientos donde no se aplicó Ogal hubo una mayor acumulación de Cu^{2+} en las hojas que en las raíces. Este comportamiento en la distribución fue mayor en el tratamiento 1, el cual solo contenía Cu^{2+} como parte de la disolución nutritiva y no en exceso como en el tratamiento 2.

Se observó además, que la dosis de 10 mg/L de Ogal provocó una distribución de los iones Cu^{2+} en las plantas semejante a la presentada en las plantas controles, aunque proporcionalmente estas tenían mayor acumulación foliar, mientras que en las que recibieron dosis más elevadas, 20 y 30 mg/L del producto, cambió el patrón de distribución de los iones Cu^{2+} y como resultado, se apreció un contenido mayor en las raíces que en las hojas.

El hecho de que cuando se aplica Ogal haya una mayor acumulación de Cu^{2+} en las raíces que en las hojas puede ser consecuencia de que este producto se aplicó a las semillas y también que este tenga una mejor traslocación basipetal que acropetal, por lo que se pudieran obtener mejores resultados en la acumulación en la parte aérea, si se realizaran aspersiones foliares, como fue corroborado por Fuentes y cols.¹⁴

Las pequeñas masas de las raíces producidas por las plantas a las que se les aplicaron oligogalacturónidos pudieron ser consecuencia de la posible formación de quelatos solubles, los cuales incrementan la traslocación de metales del sustrato a la planta según ha sido planteado por Drazkiewicz y cols.¹⁵ lo cual no permite apreciar el efecto estimulador del crecimiento que también poseen los oligogalacturonidos y que ha sido observado en diferentes cultivos por González y cols.¹⁶

Estos resultados son muy promisorios, por lo que se debe continuar profundizando en la interacción de este producto en las plantas, para poder dilucidar cuál es el mecanismo mediante el que se puede disminuir el efecto de los metales pesados en las plantas y establecer una metodología para el secuestro de los iones, a partir del conocimiento de la factibilidad de la utilización de diferentes polímeros naturales y de esta forma contar con una vía para la fitorremediación de plantas cultivadas en un medio con altos niveles de metales pesados, utilizando productos ecológicamente inocuos.^{17,18}

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guo TY, Xia YQ, Hao GJ, Song MD y Zhang BH. Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads. *Biomaterials*. 2004;25:5905-5912.
- Soraya P, Sosa M, Lebgue T, Quintana C y Campos A. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecol Apl.*, 2006;5(1 y 2):149-155.
- Trimukhe KD y Varma AJ. A morphological study of heavy metal complexes of chitosan and crosslinked chitosans by SEM and WAXRD. *Carbohydrate Polymers*. 2008;71:698-702.
- Umrana VV. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. *Bioresour Technol*. 2006; 97 (10):1237-42.
- Hernández A, Ascanio M, Morales M, Bojórquez I, García N y García D. El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo. Ed. 1, Universidad Autónoma de Nayarit, México, 2006.
- Haikel G, Mabon N, Nott K, Wathelet B y Paquot M. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*. 2006; 96(3):477-484.
- Cabrera JC. Obtención de (1-4) α -d-Oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 1999.
- Hoagland DR y Arnon DI. The water culture method of growing plants without soil. California Agriculture Experiment Station Circular, 1950: p.347.
- García SI, Sala L, Gonzalez C, Daier V, Goodman B y Atria M. Redox and complexation chemistry of the Cr(VI)/Cr(V)-d-Galacturonic acid system. *Journal of the Chemical Society*. 2004: pp.2288-2896.
- García SI Sala L, Gonzalez C, Mamana N y Signorella S. Evidence for the involvement of Cr (II) an free radicals as intermediates in the reduction of HCrO^+ by saccharides, alcohols and hydroxyacids. *Inorganic Chemistry Communications*. 9, 437-440, 2006.
- Merce ALR, Fernandes E, Mangrich AS, Sierakowski MR y Szpoganicz B. Fe(III)-Galactomannan solid and aqueous complexes. Potentiometric, EPR spectroscopy and thermal data. *J. Braz. Chem Soc*. 2001;12(6):791-798.
- Cescuti P y Rizzo R. Divalent cation interactions with oligogalacturonides. *J Agric Food Chem*. 2001; 49:3262-3267.
- Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril I, Amezaga I, Albizu I, Onaindia M y Garbisu C. Chelate-enhanced phytoremediation of soil polluted with heavy metals. *Environment Science and Bio*. 2004 ;00:1-16.
- Fuentes HD, Khoo CS, Pe T, Muiray S y Khan AG. Phytoremediation of a contaminated mine site using plant growth regulators to increase metal uptake. Waste treatment and environmental imp in the Mining Industry Vol. I, Ed. MA Sanchez, F Vergara and SH Castro, 2000.
- Drazkiewicz M., Skorzynska- Polit E. y Krupa Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (h). *Plant Sci*. 2003;164:195-202.
- González Y, Reynaldo I y Cabrera JC. Influencia de oligogalacturónidos en la germinación y el enraizamiento de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) variedad Amalia. *Cultivos Tropicales*. 2004;3:12-17.
- Marrero O. Efecto de productos naturales en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Amalia) crecidas en un medio contaminado con cobre. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana, 2005.
- Heng-Wei W, Petrisor I, Hsuan-Ting L, Daeik K y Tech Fu Y. Copper adsorption chitosan immobilized on sand to demonstrate the feasibility for in situ soil decontamination. *Carbohydrate polymer*. 2004;55:249-254.