

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA  
EN SUELOS CONTAMINADOS Y PLANTAS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Química por:**

***MATÍAS ERNESTO SEGOVIA CAQUEO***

**Director de Tesis: Dr. Jorge Mendoza Crisosto**

**Santiago-CHILE**

**Abril 2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**MATÍAS ERNESTO SEGOVIA CAQUEO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, en el examen público rendido el día

---

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mendoza Crisosto

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

M.S.c Inés Ahumada

---

Dra. Loreto Ascar

---

Dr. Alejandro Álvarez

---

*“... Porque siempre hay tiempo para volver a nacer.*

*Siempre hay tiempo para volver a vivir.*

*Siempre hay tiempo para volver a empezar*

*lo que nunca pudiste terminar”*

- Cecilia Echeñique

*“Aunque nadie ha podido regresar*

*y hacer un nuevo comienzo,*

*cualquiera puede volver a comenzar ahora*

*y hacer un nuevo final”*

-San Francisco Javier

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo.

A mi Director, Dr. Jorge Mendoza C., por su aceptación en su equipo de trabajo, dedicación, paciencia y orientación constantes en la realización de mis estudios e investigaciones.

A los profesores MSc. Inés Ahumada T., Dr. Alejandro Álvarez L. y Dra. Loreto Ascar E., miembros de la Comisión Informante por su ayuda y esfuerzo entregado al corregir, fortalecer y mejorar el trabajo realizado en este estudio. En especial, a la Prof. MSc. Inés Ahumada, por todo el cariño, apoyo y disponibilidad durante mi experiencia en esta Facultad.

A la Prof. Tatiana Garrido, por sus consejos, ayuda y apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Matías, José Miguel, Yippsia, Cristobal, Paula Torres, Paula Varela, Cristian, Francisca, Gonzalo y Gastón por su alegría y simpatía.

A mi familia; mis papás: Ernesto y Ana María, mi hermana: Claudia y mi pareja: Antonella, por su confianza y apoyo en todo momento, por el cariño y la paciencia.

A Antonella, por ser una excelente motivación para la realización de cada una de las etapas necesarias para cumplir este objetivo.

Y a Dios, quien me permitió darme cuenta que lo importante no es hacer lo que amamos, sino amar lo que hacemos.

Agradecimientos a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile por el financiamiento a través del proyecto ENL-4/12.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la disponibilidad, biodisponibilidad y bioaccesibilidad de elementos trazas presentes en niveles anormalmente altos en suelos urbanos de las ciudades de Santiago y Rancagua. Los elementos analizados fueron Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos del orden Inceptisol (Mapocho), molisol (Rancagua) y Alfisol (Cauquenes).

El desarrollo experimental implicó el uso de diferentes métodos para determinar la disponibilidad y biodisponibilidad de los metales. Además, se implementaron dos métodos para determinar la bioaccesibilidad de metales, los cuales se basan en el uso de extractantes que simulan las características de los fluidos gastrointestinales y que se aplican bajo diferentes condiciones de tiempo, pH, agitación y temperatura. Por otra parte, para evaluar la asociación del metal absorbido por la planta a diferentes estructuras vegetales, se implementó un método de fraccionamiento subcelular del tejido vegetal que distingue la fracción de metal unida a la pared celular, unida a los organelos y disuelta en el citoplasma.

Los principales resultados del estudio señalan que ambos métodos para determinar bioaccesibilidad fueron útiles para evaluar la bioaccesibilidad de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn, en los tres suelos y en plantas cultivadas; sin embargo, los métodos respondieron de manera diferente, dependiendo de las condiciones de aplicación, fuerza extractiva y contenido de metal total que presentan los sustratos.

En general, los metales presentes en el suelo fueron más bioaccesibles en la fase gástrica que en la fase intestinal. El orden en que los metales fueron bioaccesibles fue  $Cd > Pb > Zn > Cu \gg Ni > Cr$ . Por su parte, Cd, Cu y Zn fueron extraídos con ambos métodos en la fase gástrica e intestinal, tanto en suelos como en plantas, en cambio Cr, Ni y Pb fueron extraídos sólo por el fluido constituido por glicina, sólo en suelos y solamente en una de las fases.

La extracción secuencial reveló que los elementos Cd, Cu Ni y Zn se distribuyen en todas las formas en el suelo (intercambiable, reducible, oxidable y residual), en cambio Cr y Pb se asocian principalmente a las formas oxidable y residual.

En relación a la biodisponibilidad de metales en los tres suelos, Cr, Cu, Ni y Zn presentaron mayor concentración en la raíz en comparación a parte aérea, ocurriendo lo contrario en el caso de Cd. Por su parte, el fraccionamiento del tejido vegetal permitió detectar los elementos Cd, Cu y Zn asociados a los tres componentes subcelulares, predominando las fracciones de metal unido a pared celular y soluble en el citoplasma.

El estudio de correlación múltiple reveló que en suelos las variables más importantes fueron el contenido de metal total y unido en distintas formas en el suelo, siendo escasa la dependencia con variables relacionadas a propiedades fisicoquímicas del suelo, tales como pH, CIC, o contenido de arcillas y materia orgánica. En las plantas, las variables más significativas fueron el contenido de metal en la parte aérea y raíz, así como la fracción de metal unido a la pared celular y soluble en el citoplasma.

## ABSTRACT

The aim of this work was to assess trace elements availability, bioavailability and bioaccessibility present in highly abnormal levels in urban soils of Santiago and Rancagua. Cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc were analyzed in Inceptisol (Mapocho), Mollisol (Rancagua) and Alfisol (Cauquenes) order soils.

The experimental procedure implied different methods to determine metal availability and bioavailability. Furthermore, two methods were implemented to determine metal bioaccessibility, which are based on the use of gastrointestinal simulating extractants, applied under different time, pH, mixture and temperature conditions. By the other hand, in order to assess the association of metal absorbed by plants in different plant structures, a method for subcellular fractionation was implemented in order to obtain the metal fraction bounded to cell wall, organelles or dissolved in the cytoplasm.

The study main results point that both bioaccessibility methods were useful to assess Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn bioaccessibility in all of the three soils and cultivated plants; however, both methods responded in different ways, depending on application conditions, extractive strength and total metal content in the substrates.

Generally, soil metals were more bioaccessibles in gastric phase than in intestinal phase. The order in which metals were bioaccessibles was  $Cd > Pb > Zn > Cu \gg Ni > Cr$ . For their part, Cd, Cu and Zn were extracted with both methods in both gastric and intestinal phase, in soils and plants. However, Cr, Ni and Pb were extracted only by glycine fluid, solely in soils and only in one phase.

The sequential extraction revealed that Cd, Cu, Ni and Zn were distributed in all of the soil forms (exchangeable, reducible, oxidizable and residual), while Cr and Pb were mainly associated to oxidizable and residual forms.

About metal bioavailability in the three soils, Cr, Cu, Ni and Zn presented higher concentrations in roots than shoots, contrary to Cd. Plant tissue fractionation allowed the detection of Cd, Cu and Zn associated to the three subcellular components, prevailing metal linked to cell wall and dissolved in the cytoplasm.

The multiple regression analysis revealed that the most important soil parameters were total metal content and bounded in different forms, being insignificant the dependence with variables related to soil physicochemical properties, like pH, CEC, or clay and organic matter content. In plants, the most significant parameters were total metal content in shoots and roots, just like metal fraction bounded to cell wall and dissolved in the cytoplasm.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	1
1.1.	Contaminación de suelos por metales pesados.	1
1.2.	Formas químicas de un metal en el suelo	5
1.3.	Biodisponibilidad de metales pesados en los suelos	7
1.4.	Bioaccesibilidad de metales pesados	9
1.5.	Hipótesis	13
1.6.	Objetivos	14
1.6.1.	<i>Objetivo general</i>	14
1.6.2.	<i>Objetivos específicos</i>	14
<b>2.</b>	<b>Metodología</b>	15
2.1.	Selección de suelos y caracterización físico-química	15
2.1.1.	<i>pH</i>	16

2.1.2.	<i>Determinación de humedad</i>	16
2.1.3.	<i>Contenido de carbono orgánico y materia orgánica</i>	16
2.1.4.	<i>Capacidad de Intercambio Catiónico</i>	17
2.1.5.	<i>Textura y granulometría de un suelo</i>	17
2.1.6.	<i>Conductividad</i>	18
2.1.7.	<i>Contenido de metal total en muestras de suelos</i>	18
2.2.	Disponibilidad y formas del metal	19
2.3.	Determinación de la bioaccesibilidad de metales en suelos y plantas	20
2.3.1.	<i>Bioaccesibilidad mediante extracción con tampón de glicina</i>	21
2.3.2.	<i>Bioaccesibilidad mediante solución sustituta de fluidos gastrointestinales</i>	22
2.4.	Biodisponibilidad de metales mediante cultivo de plantas	23
2.4.1.	<i>Preparación de suelos fortificados con cadmio, plomo y cinc</i>	23
2.4.2.	<i>Cultivo de plantas de lechuga</i>	24

2.4.3.	<i>Determinación de metal total en tejido vegetal</i>	25
2.5.	Fraccionamiento subcelular de metal en plantas	25
2.6.	Análisis estadístico	26
<b>3.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>27</b>
3.1.	Caracterización fisicoquímica de suelos	27
3.2.	Disponibilidad de metales mediante métodos de extracción simple	28
3.3.	Contenido de metal total en suelos incubados	30
3.4.	Extracción secuencial de metales	31
3.5.	Bioaccesibilidad de metales en suelos	34
3.5.1.	<i>Bioaccesibilidad de metales mediante glicina</i>	34
3.5.2.	<i>Bioaccesibilidad en suelos mediante sustituto de fluido gastrointestinal.</i>	38
3.5.3.	<i>Bioaccesibilidad en suelos cultivados y no cultivados</i>	41
3.6.	Biomasa del cultivo de lechuga	44

3.7.	Biodisponibilidad de metales en suelos	45
3.8.	Fraccionamiento subcelular	48
3.9.	Bioaccesibilidad de metales en lechuga determinada mediante glicina	50
3.10.	Bioaccesibilidad de metales en lechuga determinada mediante extracción con fluido gastrointestinal	52
3.11.	Regresión múltiple	54
3.11.1.	<i>Regresión múltiple para la concentración bioaccesible de metales en suelos</i>	54
3.11.2.	<i>Regresión múltiple para la concentración bioaccesible de metales en plantas</i>	55
<b>4.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Anexos</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Descripción y caracterización de la toxicidad de cadmio, cobre, plomo y zinc en suelos	4
Tabla 2	Procedimiento de extracción secuencial	7
Tabla 3	Métodos de extracción simple usados en este estudio	19
Tabla 4	Caracterización fisicoquímica de suelos de Cauquenes, Rancagua y Mapocho	28
Tabla 5	Contenido de metal disponible (mg/kg) mediante extracción simple	29
Tabla 6	Contenido de metal total (mg/kg) en suelos de Cauquenes, Rancagua y Mapocho fortificados con metal	30
Tabla 7	Biomasa en base seca (g/maceta) de material vegetal obtenido de cultivos con distintos tratamientos.	44
Tabla 8	Ecuaciones de regresión múltiple para estimar la concentración de metal bioaccesible en suelos mediante glicina	55
Tabla 9	Ecuaciones de regresión múltiple y regresión simple para estimar la concentración de metal bioaccesible en plantas de lechuga mediante glicina	57

## *Anexos*

Tabla 1	Directivas de Kelley para la clasificación de suelos contaminados	65
Tabla 2	Concentración de formas químicas obtenidas para Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (mg/kg) mediante extracción secuencial de los suelos Cauquenes, Rancagua, Mapocho y suelos fortificados	66
Tabla 3	Concentración de especies químicas obtenidas para Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (%) mediante extracción secuencial de los suelos Cauquenes, Rancagua, Mapocho y suelos fortificados	67
Tabla 4	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos, mediante glicina	68
Tabla 5	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos, mediante sustituto de fluido gastrointestinal	68
Tabla 6	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados y no cultivados, mediante glicina	69
Tabla 7	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn biodisponible (mg/kg) en suelos, mediante cultivos de lechuga	70
Tabla 8	Concentración de Cd, Cu y Zn (mg/kg) alojados en la pared celular, organelos y citoplasma de células vegetales de hojas de lechuga	70
Tabla 9	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn bioaccesible (mg/kg) en hojas de lechuga, mediante glicina	71

Tabla 10	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn bioaccesible (mg/kg) en hojas de lechuga, mediante sustituto de fluido gastrointestinal	71
----------	--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación de los puntos de muestreo de suelos: Mapocho, Rancagua y Cauquenes	15
Figura 2	Distribución de formas químicas de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los suelos no fortificados con metal	33
Figura 3	Distribución de formas químicas de Cd, Pb y Zn en suelo Mapocho fortificado individualmente con cada metal y suelo no fortificado	34
Figura 4	Contenido de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho	36
Figura 5	Contenido de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho	37
Figura 6	Contenido de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho	39
Figura 7	Contenido de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho	40



Figura 8	Contenido de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados y no cultivados	42
Figura 9	Concentración de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados y no cultivados	43
Figura 10	Cultivo de lechugas en suelos Cauquenes, Rancagua, Mapocho y fortificación de suelo Mapocho con Cd, Pb y Zn	44
Figura 11	Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn total (mg/Kg) en parte aérea y raíz de lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho	47
Figura 12	Concentración de Cd, Cu y Zn (%) en pared celular (Fracción I), organelos (Fracción II) y citoplasma (Fracción III) del tejido vegetal aéreo de lechuga cultivada en distintos suelos	49
Figura 13	Concentración de Cd, Cu y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho	51
Figura 14	Concentración de Cd, Cu y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho	53

## 1. INTRODUCCIÓN

La creciente expansión urbana de las grandes ciudades está facilitando el acceso de los habitantes a suelos contaminados con metales pesados, que hasta hace pocas décadas eran suelos lejanos a los centros urbanos y con escaso impacto ambiental.

El cadmio, cobre, plomo y cinc son metales pesados descritos frecuentemente en sitios urbanos o periurbanos contaminados, que pueden llegar al ser humano a través de la ingestión accidental de los suelos. La cantidad que puede ingresar al organismo dependerá de varios factores, entre éstos, la cantidad de material ingerido y la forma química del metal en la matriz del suelo. Por otra parte, el cultivo de hortalizas en suelos con alto contenido de metal es una actividad frecuente en sitios cercanos a las grandes ciudades, alentada por la necesidad de este tipo de alimentos a un menor costo. Sin embargo, esta práctica, a lo largo de los años, puede implicar la acumulación de metales en el organismo y una posible toxicidad por metales. Ambas situaciones pueden coexistir en zonas aledañas a las ciudades densamente pobladas, como Santiago y Rancagua en la zona central de Chile.

### 1.1. Contaminación de suelos por metales pesados.

La contaminación por metales pesados es uno de los tipos de contaminación de suelos más comunes. Si bien los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre, estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general, esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones

vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación de los suelos, aguas superficiales y subterráneas y de los ambientes acuáticos (Sposito y col., 2008; Yaron y col., 1996).

En general la movilidad de los metales pesados es muy baja, quedando acumulados en los primeros centímetros del suelo, siendo lixiviados a los horizontes inferiores en muy pequeñas cantidades. Por eso la presencia de altas concentraciones en el horizonte superior decrece drásticamente en profundidad, cuando la contaminación es antrópica. Esto sucede precisamente porque la disponibilidad de un elemento depende también de las características del suelo en donde se encuentra (Anxiang y col., 2009). Los parámetros geoedáficos que llegan a ser esenciales para valorar la sensibilidad de los suelos a la agresión de los contaminantes son:

- pH: la mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos, excepto As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino.
- Textura: los suelos con alto contenido de arcillas retienen más metales por adsorción o en el complejo de cambio de los minerales de arcilla. Por el contrario, los arenosos carecen de capacidad de fijación y pueden favorecer la contaminación del nivel freático.
- Mineralogía de arcillas: cada mineral de arcilla tiene unos determinados valores de superficie específica y de descompensación eléctrica. Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayores son sus posibilidades de adsorber metales. Este poder de adsorción será máximo en el punto de carga cero superficial, cuando su competencia con los  $H^+$  es mínima, lo que se consigue a diferentes pH según el mineral. Sin embargo, la importancia de los minerales de la arcilla como adsorbentes es secundaria, cuando en un suelo existe abundante materia orgánica y/o oxihidróxidos de hierro, componentes que son más competitivos.

- **Materia orgánica:** reacciona con los metales formando complejos solubles. La adsorción puede ser tan fuerte que quedan estabilizados, como el caso del Cu, o forman quelatos también muy estables, como puede pasar con el Pb y Zn. En muchos casos se forman complejos organometálicos, lo que facilita la solubilidad del metal, la disponibilidad y dispersión, ya que pueden ser biodegradados por los organismos del suelo. Esto conduce a una persistencia de la toxicidad.
- **Capacidad de intercambio catiónico:** esto depende del tipo de minerales de la arcilla, de la materia orgánica, de la valencia y del radio iónico hidratado del metal. A mayor tamaño y menor valencia, menos frecuentemente quedan retenidos. Respecto a los minerales de arcilla, la retención es mínima para los minerales del grupo del caolín, baja para las illitas, alta para las esmectitas y máxima para las vermiculitas.
- **Óxidos e hidróxidos de Fe y Mn:** juegan un importante papel en la retención de metales pesados y en su inmovilización. Se encuentran finamente diseminados en la masa de suelo, por lo que son muy activos. Por su baja cristalinidad y pequeño tamaño de partícula, tienen una alta capacidad sorbitiva de metales divalentes, especialmente Cu y Pb y en menor extensión Zn, Co, Cr, Mo, Ni y también As. Otros factores que pueden tener influencia en la movilidad de metales pesados en los suelos, son el potencial de óxido-reducción, la presencia de carbonatos y la salinidad del suelo (Galán y Romero, 2008).

La contaminación de suelos por altas concentraciones de metales puede presentar una serie de efectos tóxicos, dependiendo del metal que los cause. Los casos principales de este estudio representan los siguientes elementos traza, presentados en la Tabla 1:

Tabla 1: Descripción y caracterización de la toxicidad de cadmio, cobre, plomo y zinc en suelos (Yaron y col., 1996).

Metal	Origen antrópico	Concentración normal (mg/Kg)	Efectos tóxicos en seres humanos
Cd	Lodos y efluentes industriales, fertilizantes, precipitación radiactiva y disposición de residuos radiactivos.	0,1-10	Carcinogénico, posible causante de la enfermedad de Itai-Itai.
Cu	Residuos industriales, aditivos para alimentos, fertilizantes, abonos, lodos y efluentes, deposición de material particulado	1-50	Vómitos, náuseas, mareos, daño hepático.
Pb	Gasolina, deposición de material particulado, residuos industriales, fundiciones, disposición de lodos, efluentes de alcantarillado y fertilizantes.	1-20	Acumulable y tóxico.
Zn*	Fertilizantes, lodos y material particulado de origen industrial	10-300 1-900	Relativamente inocuo.

\* Se puede presentar en ambas concentraciones en distintos suelos.

La contaminación por metales pesados es un problema que ha sido motivo de estudio en muchos países. Por ejemplo, en Italia se presentan zonas de alta contaminación en los suelos de Grugliasco, debido inicialmente a la inserción de la industria automotriz en 1950, lo que impulsó al aumento de la población, el aumento de tráfico vehicular y disminución de las áreas verdes. Esto llevó a un alza en la concentración de metales pesados (Cu, Ni, Pb y Zn), tanto en zonas residenciales como en zonas agrícolas (Poggio y col., 2009). En China, el desarrollo de la industria minera y metalúrgica ha provocado, en terrenos de hasta 12.000 ha., el incremento de la concentración de Cd, presentándose este fenómeno en 11 regiones. Además, en zonas agrícolas, se han registrado niveles entre 1-2 mg/kg en plantas de arroz (Cheng, 2003).

Al igual que otros países, Chile depende de actividades económicas que le significan al país distintos focos de contaminación. En la zona central de Chile, especialmente en las regiones V, VI y Metropolitana, las principales actividades económicas que significan un foco de contaminación son la minería, destacándose dentro de esta área la VI región. Además, se realizan actividades de saneamientos y de disposición de residuos. Sin embargo, las actividades mineras destacan en todo el país, al provocar un alto impacto ambiental para el suelo, debido a los procesos asociados a la exploración y explotación, así como de los procesos de transformación

pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos y refinación de sustancias minerales y de sus productos (Ministerio de Medio Ambiente, Chile, 2011).

En las regiones mencionadas, se puede hacer hincapié en las concentraciones nocivas de metales pesados que son propias de las actividades económicas de la zona. Por ejemplo, en la V región se destaca la contaminación por Cd, Cu y Pb; en la VI región, Cu y Zn; y en la Región Metropolitana, Cd, Cu y Zn. Sin embargo, la preocupación mayor es abordada por el Cu y Cd, presentes en las tres regiones mencionadas, mientras que otros metales, tales como Zn, Pb y Mn presentaron valores mucho más preocupantes en las regiones IV y XI (Acevedo y col., 2005).

## **1.2. Formas químicas de un metal en el suelo.**

Los metales pesados pueden integrarse al suelo de distintas formas, dependiendo de la afinidad que tengan con los compuestos que forman la estructura edáfica y las propiedades del suelo. Esto es importante, ya que muchos estudios, incluso normas internacionales (Belmonte y col., 2010; Poggio y col., 2009), indican que de la concentración total de un metal en el suelo, sólo una fracción ingresa realmente a los seres vivos. Ante esto, si un metal está débilmente enlazado a alguno de los componentes del suelo, ya sea en solución o en la fase sólida, aumenta su disponibilidad, ya que podría aumentar su solubilidad con sólo modificar ligeramente alguna propiedad del suelo, como reducir el pH y el potencial redox del suelo (González y col., 2009).

Para poder definir la disponibilidad de los metales en el suelo se han desarrollado variadas técnicas, las cuales buscan determinar la concentración de metal que puede ser liberada de los distintos componentes del suelo o que puede quedar a disposición de las plantas. Estas técnicas consistieron inicialmente en extracciones simples. Algunos ejemplos son la extracción con  $\text{CaCl}_2$ , que se ha utilizado para simular la fracción biodisponible de los metales en plantas y para

determinar la presencia de boro en suelos (Sadzawka y col., 2000; Houba y col., 1996). Por su parte, las propiedades complejantes del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como extractante simulan de mejor forma los procesos de absorción por las plantas, siendo más ventajoso que el uso de  $\text{CaCl}_2$  (Kucak y Blanusa, 1998). Similarmente, la extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), al igual que el EDTA, simula bien la biodisponibilidad, pero arroja valores más reproducibles en suelos neutros o alcalinos, contrariamente al EDTA (Feng y col., 2005a). El uso de ácidos orgánicos de cadena corta, ha sido otro tipo de extracción simple que se ha extendido en las últimas décadas, debido a la similitud con procesos naturales de exudación de éstos ácidos por los microorganismos del suelo y por las raíces de las plantas, en este sentido se han usado ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como el ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, entre otros (Feng y col., 2005b; Wuana y col., 2010). Paralelamente se han desarrollado métodos de extracción secuencial, los cuales consisten en la aplicación sucesiva de varios extractantes que van incrementando su fuerza extractiva. El empleo de estas metodologías extracción secuencial suministra información más detallada sobre el origen, forma química, disponibilidad biológica, movilización y transporte de metales pesados (Vilar y col., 2003). Se conocen varios métodos de extracción secuencial. Algunos ejemplos son el método de Tessier (Tessier y col., 1979), el método de Sposito (Sposito y col., 1989) y el método de Gomes (Gomes y col., 1997). Estas técnicas son capaces de determinar las concentraciones de metal ligado a la fase intercambiable y orgánica de los suelos, pero el método de Tessier no distingue entre la fracción soluble e intercambiable, como sí lo hace el método de Gomes, mientras que este último es capaz de diferenciar la fracción orgánica de la unida a sulfuros, al contrario de lo que ocurre con los métodos de Tessier y Sposito (Vilar y col., 2003).

Debido a la existencia de varios métodos de extracción secuencial y a la complejidad que algunos de ellos presentan, la Community Bureau of Reference (BCR) ha diseñado un método

que trata de armonizar y simplificar los métodos existentes, por lo que en la última década ha sido uno de los más estudiados (Mendoza y col., 2006; Garrido y Mendoza, 2008; González y col., 2009; Mossop y Davidson, 2003). El método BCR consiste en una extracción de tres etapas, en la que cada etapa corresponde a una forma del metal, más una cuarta (residual) que se utiliza como recurso para estimar balance de masas (Mossop y Davidson, 2003) (Tabla 2).

Tabla 2: Procedimiento de extracción secuencial (Mossop y Davidson, 2003).

Etapa	Fracción	Descripción	Procedimiento
1	Soluble	Metal intercambiable y soluble en agua, débilmente enlazado a materia orgánica y carbonatos	Ácido acético 0,11 mol/L
2	Reducible	Metal enlazado a óxidos de hierro y manganeso.	Hidroxilamina 0,1 mol/L, pH 2
3	Oxidable	Metal enlazado a materia orgánica o formando sulfuros.	Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Acetato de amonio 1 mol/L a pH 5
4	Residual		Digestión ácida: agua regia

### 1.3. Biodisponibilidad de metales pesados en los suelos.

La biodisponibilidad se define como el grado en el que las sustancias químicas presentes en el suelo, pueden ser absorbidas o metabolizadas por receptores humanos o naturales, o quedar disponibles para interactuar con los sistemas biológicos (ISO/DIS 17402, 2006).

Normalmente sólo una fracción pequeña de una sustancia potencialmente contaminante de un medio es biodisponible. La biodisponibilidad de un elemento es función de la forma química en que se encuentra en el medio; y la capacidad de los organismos para absorberlo o ingerirlo. Estos elementos pueden ser acumulados en el organismo en concentración, de varios órdenes de magnitud mayor que la concentración del medio donde vive (bioacumulación) (Galán y Romero, 2008). Una vez que esto ocurre, el compuesto puede almacenarse, transformarse, ser asimilado o degradado dentro del organismo, dependiendo del medio ambiente y el organismo (Semple y col., 2004).



Hay varios factores involucrados al determinar la biodisponibilidad, como por ejemplo las propiedades del suelo, la especiación de metales, la especie vegetal a aplicar para extraer el metal, la relación entre la raíz y la planta, etc. (Feng y col., 2005a). Es así como se han desarrollado análisis con plantas para estudiar la biodisponibilidad de metales pesados en suelos contaminados (Intawongse y Dean, 2008; Chojnacka y col., 2005; Black y col., 2011), en donde se relaciona la cantidad de metal absorbido con la cantidad de metal a la que ha sido expuesto el organismo en un determinado tiempo.

Por otra parte, se han desarrollado métodos para medir la biodisponibilidad que buscan simular los procesos biológicos que ocurren en plantas o animales y que permiten entender el comportamiento de los metales pesados en variadas situaciones ambientales. Los estudios de biodisponibilidad más comunes corresponden a:

- Modelo de actividad de iones libres (FIAM): este modelo busca describir las interacciones metal-organismo de todos los metales traza de tipo catiónico (Peijnenburg y Jager, 2003).
- Correlación entre los metales lábiles en suelos, determinados por métodos de extracción simple o secuencial, y su acumulación en plantas: estos modelos, por medio de agentes extractantes, permiten conocer la especiación metálica, lo cual se ha complementado con métodos de fraccionamiento secuencial.
- Método de intercambio por dilución isotópica: El método determina la cantidad de metal reactivo en el suelo, y se aplica normalmente para describir el equilibrio entre el metal disuelto y ligado a la fracción sólida del suelo, así como para estudiar la asimilación progresiva de iones metálicos a formas menos reactivas (Young y col, 2006).

- Gradientes de difusión en capa fina (DGT): consiste en la instalación de un dispositivo en el suelo que tiene en su interior resinas quelantes para metales, disminuyendo las concentraciones de metales, y una membrana de gel difusor, simulando la absorción de las plantas y favoreciendo la difusión selectiva de los iones y sus complejos (Zhang y col., 2001).

#### **1.4. Bioaccesibilidad de metales pesados.**

La fracción bioaccesible de un metal representa a la fracción que es liberada a partir de su matriz (suelo, planta, sedimento), una vez que esta matriz ha sido ingerida por un organismo vivo. En el caso del ser humano la liberación de la fracción bioaccesible ocurre en el espacio gastrointestinal, en el proceso de la digestión, quedando potencialmente disponible para absorción intestinal. La fracción bioaccesible puede también definirse como aquella fracción que, después de la ingesta, puede ser movilizadada hacia los fluidos gástricos. En el caso de un contaminante, se considera que esta fracción representa la cantidad máxima de contaminante disponible para absorción intestinal (Poggio y col., 2009; Peijnenburg y Jager, 2003). Los contaminantes bioaccesibles pueden eventualmente ser absorbidos, es decir, transportados a través de la pared intestinal y ser transferidos al flujo sanguíneo o linfático. Dichos contaminantes pueden ser transformados y excretados en el epitelio intestinal o hígado. Después de esto, el contaminante alcanza la circulación sistémica y posteriormente el resto del cuerpo, pudiendo ejercer toxicidad (Peijnenburg y Jager, 2003). Sin embargo, la bioaccesibilidad de metales y otros contaminantes, desde suelos o sedimentos, es altamente dependiente del pH de los diferentes órganos del tracto gastrointestinal; por lo tanto se requieren métodos que diferencien claramente

las condiciones bajo las cuales ocurriría la absorción en los diferentes órganos (Poggio y col., 2009; Oomen y col., 2003).

Son muchos los estudios que han buscado desarrollar y validar sustitutos de los fluidos naturales del tracto gastrointestinal. Los más estudiados han sido los fluidos estomacales (gástricos) e intestinales (Laird y col., 2011; Turner, 2011). Si bien los estudios *in vitro* se diferencian unos de otros, la mayoría de los fluidos estomacales desarrollados se asemejan en su contenido de ácido clorhídrico a pH 1,5, sumado a algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y sales (Li y col., 2011; Sun y col., 2012), mientras que en los fluidos intestinales se utiliza la misma solución con un ajuste de pH a 7 y la adición de sales biliares y enzimas excretadas al intestino delgado y al duodeno (Li y col., 2011; Sun y col., 2012). Sin embargo, no sólo la composición del fluido importa, sino también algunas variables como la temperatura, tiempo de digestión y composición de la fase gaseosa, las cuales deben ser controladas. Las pruebas de bioaccesibilidad *in vitro* son simples, reproducibles y de bajo costo, al no requerir trabajo con animales, como sería el caso de las pruebas *in vivo* (Marques y col., 2011; Reeder y col., 2006).

Los metales y metaloides son los contaminantes que se han estudiado mayoritariamente gracias a las pruebas de bioaccesibilidad, especialmente los estudios relativos al Pb, As y Hg. En un estudio realizado por Lamb y col., (2009) se ha analizado el comportamiento del Pb en suelos contaminados y no contaminados, para determinar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad en suelos y plantas. Los resultados indicaron que el Pb en la solución de suelo presentaba una baja concentración, no así en suelos, en donde no sólo había una alta concentración, sino que la bioaccesibilidad del metal era directamente proporcional al metal total de los suelos. Por otro lado, en un estudio con arsénico (Meunier y col., 2010), se relacionó la bioaccesibilidad con la composición del suelo y la mineralogía de relaves mineros. Los resultados mostraron que entre el

0,1-49% del total era bioaccesible, presentando una baja correlación entre la bioaccesibilidad y el arsénico total. Se identificaron más de siete especies de As, siendo algunas las que afectan la bioaccesibilidad. La mayor bioaccesibilidad (49%) se asoció a la presencia de arseniato de calcio y hierro, y la más baja (<1%) se asoció a la presencia de arsenopirita o escorodita. También se estudió el efecto de la materia orgánica en la bioaccesibilidad de As, la que provocó un aumento en esta.

Si bien se ha estudiado la bioaccesibilidad en suelos, hay pocos estudios en plantas. En este contexto, se ha estudiado la bioaccesibilidad de Cr, Cd, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb y Zn en vegetales como zanahorias, lechugas, rábanos y espinacas cultivados en suelos contaminados (Intawongse y Dean, 2008). El balance de masas de todos los elementos mostró una buena coincidencia entre la fracción bioaccesible y el metal total. En general, la fase intestinal presentó una mayor cantidad de metal extractable que la fase gástrica. En otro estudio (Ovca y col., 2012), se pudo distinguir las diferentes especies de Zn en plantas de lechuga y calabaza. Estas especies quedan en su forma libre a pH gástrico (pH 2), pero bajo las condiciones del intestino (pH 7) ocurre la formación de complejos insolubles, especialmente en las semillas de calabaza, implicando una reducción en la biodisponibilidad de Zn.

Si bien las pruebas de bioaccesibilidad oral pueden aportar importantes datos sobre toxicidad, hay que recordar que la mayor ingesta de metales puede realizarse a través del consumo de vegetales y hortalizas cultivadas en suelos contaminados. Los metales que ingresan a la estructura vegetal pueden distribuirse y alojarse en las estructuras subcelulares de diferentes maneras y en diferentes concentraciones (Weigel y Jager, 1980). Se han llevado a cabo estudios que han comprobado la distribución de cadmio en la membrana celular, en organelos y en la fracción soluble, en plantas de porotos y moluscos bivalvos (Wallace y col., 2003; Weigel y Jager, 1980). En el caso de la planta, por ejemplo, se encontró que gran parte del cadmio se

concentra en la fracción soluble, ligado a los compuestos orgánicos disueltos, variando su concentración entre la raíz y las hojas de la planta (Weigel y Jager, 1980). En otro estudio, se evaluó la acumulación de cobre y distribución intracelular en la especie *Elsholtzia splendens*, una especie de origen Chino que es tolerante a dicho metal, en raíces, tallos y hojas. Para ello, se expuso a la planta a soluciones concentradas de cobre. En el caso de la solución de 500  $\mu\text{mol/L}$ , hubo una exposición de 8 días, alcanzándose una concentración de 1000 mg/kg en los tallos y 250 mg/kg en las hojas. Las concentraciones de cobre decrecieron según: cloroplasto > pared celular > fracción soluble > otros organelos. La mayor concentración de Cu se encontró en la pared celular de las raíces. Conforme aumentaba el tiempo de exposición, hubo un leve incremento en dicha concentración, mientras que en la fracción del cloroplasto disminuía (Hongyun y col., 2005). Otro estudio se llevó a cabo con Cr, en el que se buscaba determinar la distribución subcelular del metal en la especie *Leersia hexandra* Swartz, una planta originaria de China que acumula Cr. Se encontró que dicha planta acumulaba Cr principalmente en la pared celular proveniente de las raíces y en las vacuolas en las hojas. Si se aplicaba una solución de 60 mg/L de Cr, el 83,2% del cromo de las raíces se localizaba en la fracción de la pared celular, mientras que el 57,5%, de las hojas lo hacía en las vacuolas y en la fracción citoplasmática. Si bien se intentaron distintos tratamientos (5, 30 y 60 mg/L), la fracción que presentó una menor concentración de Cr fue la fracción de los organelos en las raíces, al igual que las hojas, dando por confirmado los resultados obtenidos previamente, considerando que el Cr se acumulaba preferentemente en la pared celular de las raíces y en las vacuolas de las hojas (Liu y col., 2009). Sin embargo, no se han descrito estudios que relacionen la distribución subcelular de un metal con su bioaccesibilidad, siendo posible que metales que se asocian a fracciones subcelulares solubles, sean más biodisponibles que metales más asociados a la pared celular o a los organelos.

El presente estudio se plantea considerando que cadmio, cobre, plomo y cinc son elementos que presentan toxicidad para el ser humano, por lo que es necesario conducir estudios de bioaccesibilidad que permitan estimar certeramente la fracción del elemento que es potencialmente biodisponible y cómo se relaciona esta magnitud con la forma del elemento en el suelo, así como el sitio de absorción preferente en el tracto gastrointestinal. Adicionalmente, estudiar la relación entre distribución subcelular y bioaccesibilidad de un metal a partir de una planta, permitiría explicar las diferencias en bioaccesibilidad que pueden presentar los elementos en estudio y compararlos no sólo en su toxicidad *per se*, sino, que también evaluar su toxicidad en asociación a la matriz que los contiene.

### **1.5. Hipótesis.**

- 1.- Una fracción de los metales pesados presentes en suelos urbanos contaminados y en las plantas cultivadas en estos suelos, se encuentra en forma bioaccesible para el ser humano.
- 2.- La bioaccesibilidad del metal a partir del suelo y la planta, se relaciona con las formas del metal y con las propiedades del suelo tales como pH, contenido de materia orgánica, textura, entre otras.
- 3.- La bioaccesibilidad del metal es directamente proporcional al contenido de metal en la fracción soluble en las células de la planta.

## **1.6. Objetivos.**

### 1.6.1. Objetivo general.

Evaluar la disponibilidad, biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los elementos cadmio, cinc, cobre, cromo, níquel y plomo en suelos contaminados.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar física y químicamente los suelos contaminados obtenidos de áreas urbanas de la zona central.
- 2.- Determinar la disponibilidad y las distintas formas del metal en el suelo, mediante procedimientos de extracción simple y secuencial.
- 3.- Implementar dos métodos para evaluar la bioaccesibilidad de metales pesados, uno de ellos que considera solamente la fase gástrica y el otro que considera la fase gástrica e intestinal.
- 4.- Evaluar la biodisponibilidad de metales mediante el cultivo de plantas de lechuga.
- 5.- Evaluar la bioaccesibilidad de metales en plantas y suelos contaminados mediante los dos métodos implementados en el objetivo 3.
- 6.- Relacionar el metal bioaccesible con las propiedades fisicoquímicas del suelo y con las formas del metal.
- 7.- Implementar un método para el fraccionamiento subcelular del metal en la planta y relacionar la distribución del metal con su bioaccesibilidad.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Selección de suelos y caracterización físico-química.

Se estudiaron tres suelos provenientes de zonas urbanas de las ciudades de Santiago y Rancagua. Un suelo del orden Inceptisol (Mapocho), un suelo del orden molisol (Rancagua) y un suelo del orden Alfisol (Cauquenes). Todos los suelos fueron secados, molidos y tamizados. Los suelos corresponden a los sectores que se muestran en la Figura 1. Los tres suelos han sido seleccionados basándose en la alta concentración de cobre que presentan. La caracterización de suelos consideró la determinación de carbono orgánico, contenido de agua, materia orgánica, textura, pH, capacidad de intercambio catiónico, conductividad y contenido de metal total.

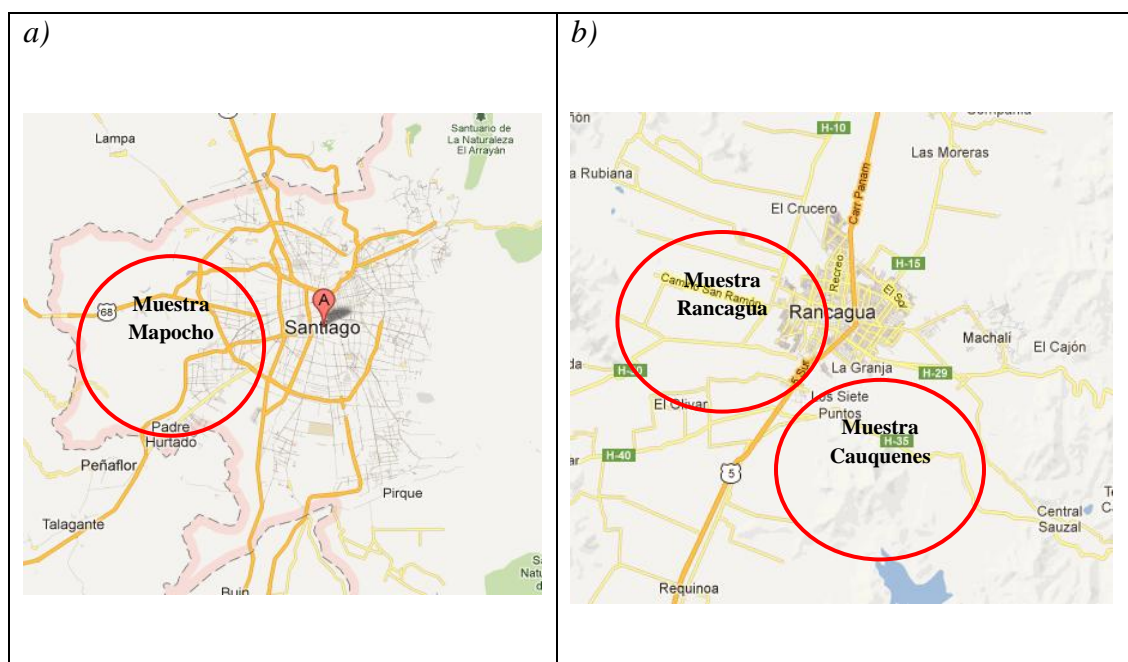


Figura 1: Ubicación de los puntos de muestreo de suelos: (a) Mapocho; (b) Rancagua y Cauquenes.  
Fuente: Google Earth 2013.



Las determinaciones para caracterizar el suelo se realizaron preferentemente en triplicado o en más repeticiones, y consistieron en las siguientes actividades:

#### 2.1.1. pH

Se determinó en agua y una solución de KCl de concentración 1 mol/L. Se pesó 10 ( $\pm 0,01$ ) gramos de suelo, se agregó agua o solución en razón 1:2,5 m/v y se agitó por 5 minutos. Se dejó reposar durante 2 horas, se volvió a suspender y se determinó el pH con un electrodo combinado asociado a un potenciómetro.

#### 2.1.2. Determinación de humedad.

Se pesó 5 ( $\pm 0,001$ ) gramos de suelo en un recipiente de tara conocida. Se secó el suelo a 105°C hasta conseguir un peso constante, lo que usualmente tarda 24 horas. Por diferencia, se calculó el contenido porcentual de agua en relación a la masa seca y un factor de humedad (Fh), el cual se usa para corrección de los datos de suelos obtenidos.

#### 2.1.3. Contenido de carbono orgánico y materia orgánica.

Se aplicó el método de Walkley-Black para determinar el contenido de carbono orgánico de la muestra. Para ello, se prepara una mezcla entre un exceso de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  en medio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Al aplicar esta mezcla al suelo, esto provoca la combustión húmeda de la materia orgánica. Posteriormente, se cuantificó colorimétricamente Cr (III) en un espectrofotómetro Unicam UV-2 (UV-Visible), a una longitud de onda de 600 nm.

Una vez estimado el contenido de carbono orgánico, se calculó el contenido de materia orgánica mediante el factor de Van Bemmelen, equivalente a 1,72 para suelos.

#### 2.1.4. Capacidad de Intercambio Catiónico.

Se determinó por medio del método de acetato de sodio a pH 8,2. En primera instancia, el tratamiento permite intercambiar los cationes disponibles por sodio, para luego liberarlos mediante el intercambio con ión amonio. Se analizó posteriormente el contenido de sodio por emisión mediante un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 3110).

#### 2.1.5. Textura y granulometría de un suelo.

Para determinar la cantidad de arcilla, limo y arena se aplicó el método del hidrómetro. Para ello, se pesaron 50 g ( $\pm 0,1$ g) de suelo en un vaso precipitado de 1 L. Se vertieron 700 mL de agua MilliQ y 20 mL de pirofosfato de potasio al 10%. Se agitó la suspensión durante 15 minutos. Luego, se trasvasió el contenido a una probeta de 1 L para aforar hasta este volumen. Se tapó la boca de la probeta para posteriormente agitar durante un minuto. Se dejó reposar por 4 minutos. Después, se midió la temperatura ( $T_1$ ) y se registra la lectura del hidrómetro ( $L_1$ ). Una vez finalizadas las lecturas, se dejó reposar la suspensión durante dos horas. Nuevamente, se registraron los parámetros previamente descritos ( $T_2$  y  $L_2$ ).

Las lecturas del hidrómetro requieren una corrección por medio de la temperatura, la que se estima mediante la siguiente ecuación:

$$L_1 \text{ corregida} = L_1 \pm ((T_1^{\circ}\text{F}-67^{\circ}\text{F}) * 0.2)$$

$$L_2 \text{ corregida} = L_2 \pm ((T_2^{\circ}\text{F}-67^{\circ}\text{F}) * 0.2)$$

Las lecturas corregidas permiten determinar el porcentaje de arena, limo y arcilla, según las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Arena} = 100 - (L_1 \text{ corregida} * 2)$$

$$\% \text{ Arcilla} = L_2 \text{ corregida} * 2$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ arena} + \% \text{ arcilla})$$

Para determinar la textura del suelo, se interpretaron los porcentajes por medio de un triángulo de texturas.

#### 2.1.6. Conductividad.

Para determinar la conductividad, fue necesario hacer una pasta saturada de 100 g ( $\pm 0,1$  g) de suelo y agua en un vaso precipitado de 400 mL. Al día siguiente, la pasta se filtró al vacío por medio de un embudo Büchner. La conductividad fue determinada en el extracto acuoso mediante un equipo Thermo, modelo Orion 3.

#### 2.1.7. Contenido de metal total en muestras de suelos.

Se pesaron 200 mg ( $\pm 0,1$  mg) de muestra seca y se trasladaron a vasos de teflón para microondas. Luego, se agregó 4 mL de HNO<sub>3</sub> al 69%, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y 2 mL de HF al 40%. Para acelerar la mineralización la muestra fue digerida en horno microondas Milestone MLS 1200 Mega, utilizando el siguiente programa: 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W. Posteriormente los vasos fueron enfriados por medio de baño de agua. Una vez fríos, se vertió la solución resultante en vasos de teflón de mayor ancho para, por medio de placa calefactora, evaporar el exceso de HF. El producto, una mezcla siruposa, se diluyó con ácido clorhídrico 1 mol/L y se llevó a un volumen final de 25 mL con agua MilliQ. La cuantificación

de metales totales se llevó a cabo mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) con llama.

## 2.2. Disponibilidad y formas del metal.

Para determinar el metal extractable o disponible, se utilizaron los siguientes métodos (Tabla 3).

Tabla 3: Métodos de extracción simple usados en este estudio.

Método de Extracción	Procedimiento	Tiempo de agitación (h)
DTPA <sup>[a,b]</sup>	10,0 g de suelo en 20 mL de DTPA 0,005 mol/L + TEA 0,01mol/L + CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol/L, ajustado a pH 7,3.	2
CaCl <sub>2</sub> <sup>[a,b]</sup>	2,0 g de suelo en 20 mL de CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol/L.	3
Ácido acético <sup>[b]</sup>	1 g de suelo en 20 mL de ácido acético 0,11 mol/L	16
Ácido cítrico <sup>[c]</sup>	1 g de suelo en 25 mL de ácido cítrico 0,05 mol/L	16
Ácido tartárico <sup>[c]</sup>	1 g de suelo en 25 mL de ácido tartárico 0,05 mol/L	16

<sup>a</sup> Feng y col., 2005a; <sup>b</sup> Feng y col., 2005b; <sup>c</sup> Wuana y col., 2010.

Para la extracción secuencial de elementos desde el suelo se utilizó el método BCR (Mossop y Davidson, 2003; Garrido y Mendoza, 2008), tal cual fue descrito previamente en la tabla 2. La masa a estudiar corresponde a 500 mg ( $\pm 0,1$  mg) de suelo tarado en un tubo previamente pesado, al que se aplica 10 mL de una solución de ácido acético 0,11 mol/L. Esta mezcla se suspende y se deja agitar durante la noche. Una vez centrifugada y filtrada, esta solución permite determinar la concentración de metal intercambiable y soluble en agua, débilmente enlazado a carbonatos y materia orgánica del suelo (Fracción I). Posteriormente, tras

tarar el tubo con la muestra resultante, se agrega una solución de hidroxilamina 0,1 mol/L ajustada a pH 2. Tras aplicar el mismo procedimiento que el extractante anterior, la solución resultante representará al metal ligado a óxidos de hierro y manganeso, también conocida como fracción reducible (Fracción II). La última etapa corresponde a la fracción oxidable (Fracción III), es decir, el contenido de metal ligado a la materia orgánica. Para esto, se debe oxidar la materia orgánica por medio de la adición de 10 mL de peróxido de hidrógeno, reactivo que debe evaporarse hasta sequedad en un baño termorregulado. Una vez hecho esto, se agregan 12,5 mL de acetato de amonio 1 mol/L ajustado a pH 5. Con respecto a la última fracción residual, se puede realizar un balance de masas entre la diferencia del contenido de metal total del suelo y la suma de las tres fracciones previamente descritas.

En todos los procedimientos mencionados, la determinación de metales fue realizado por EAA con llama.

### **2.3. Determinación de la bioaccesibilidad de metales en suelos y plantas.**

De los estudios descritos en literatura se seleccionaron dos de las pruebas más usadas para evaluar la bioaccesibilidad de metales en diferentes matrices (Saikat y col, 2007; Intawongse y Dean, 2008; Sialelli y col. 2011). Estas pruebas fueron aplicadas a los suelos incubados y plantas de lechuga cultivada en los mismos suelos.

### 2.3.1. Bioaccesibilidad mediante extracción con tampón de glicina:

#### Extractantes:

- Fase gástrica: Simula la extracción de compuestos a partir de la matriz por la acción de los jugos gástricos en el estómago. Se usa una solución de glicina 0,4 mol/L, ajustada a pH  $1,5 \pm 0,5$ .
- Fase intestinal: Simula la extracción de compuestos a partir de la matriz, por la acción de los jugos gástricos provenientes en el estómago más los aportados por la primera parte del intestino. Se usa la solución de glicina de la fase anterior con pH ajustando a pH  $7 \pm 0,5$ .

#### Procedimiento:

Se pesa 0,4 ( $\pm 0,001$ ) g de muestra y se traslada a un tubo de centrifuga de polipropileno 50 mL, se vierten 40 mL de solución de fase gástrica a 37°C. Se agita durante una hora en una incubadora a 37°C. Luego se centrifuga a 3000 rpm x 5 min. Se registra el pH de la solución, valor que no debe salir del rango de acidez de la solución inicial (pH  $1,5 \pm 0,5$ ). Se extraen 10 mL de la solución que se filtran mediante membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Esta solución permitirá determinar la concentración bioaccesible en la fase gástrica. Después se vierten cuidadosamente 10 mL de solución de glicina a la suspensión restante en el tubo y se ajusta el pH. Se agita durante 3 horas a 37°C, se centrifuga y se extrae una porción de la solución para ser filtrada mediante membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Este extracto se usa para determinar la concentración bioaccesible intestinal. Se debe registrar el pH de la solución restante, asegurándose que el pH siga dentro del rango establecido (pH  $7 \pm 0,50$ ).

### 2.3.2. Bioaccesibilidad mediante solución sustituta de fluido gastrointestinal.

#### Extractantes:

- Fase gástrica: Corresponde a la primera etapa del proceso de extracción. Se requiere una solución ajustada a pH 1,5 (HCl), compuesta por pepsina, ácido DL-málico, citrato de sodio y ácido láctico, en las concentraciones 1250 mg/L, 500 mg/L, 570 mg/L y 420  $\mu$ L/L, respectivamente. Su uso debe ser inmediato.
- Fase intestinal 1: Se obtiene por acción de la solución de la fase gástrica pero ajustado el pH a  $7,0 \pm 0,5$  con bicarbonato y se agregan sales biliares (175 mg por cada 100 mL) y pancreatina (50 mg cada 100 mL). El tiempo de agitación corresponde a dos horas.
- Fase intestinal 2: Se obtiene aplicando la misma solución de la Fase intestinal 1 por 1,5 horas y manteniendo el pH en 7.

#### Procedimiento:

Se vierte en un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, 0,400 g de muestra y se agregan 40 mL de solución de fase gástrica a 37°C. Se agita a la misma temperatura en la incubadora durante una hora. Posteriormente se centrifuga a 4250 rpm durante 5 min. Se debe registrar el pH de la solución resultante, recordando mantener el rango de pH de la solución inicial. Luego, se extrae una alícuota de 10 mL de la solución resultante y se filtra. Esta solución representará a la bioaccesibilidad en la fase gástrica. Luego, se vierte cuidadosamente 10 mL de la solución para la neutralización de la fase gástrica y formación de la fase intestinal 1. Luego, se

agita durante 2 horas a 37°C. Se centrifuga y extraen 10 mL de la solución resultante para ser filtrada y almacenada. Este extracto representará al fluido del intestino delgado. Posteriormente, se registra el pH de la solución restante, asegurando que el pH siga dentro del rango establecido ( $\text{pH } 7,0 \pm 0,5$ ). Se vierten 10 mL de solución gástrica y se agita durante 1,5 horas. Posteriormente, se centrifuga y se extrae una cantidad de solución que se filtra. Este extracto, finalmente, representará al fluido del intestino grueso. Registrar el pH de la solución resultante, el cual no debe ser distinto a neutro.

#### **2.4. Biodisponibilidad de metales mediante cultivo de plantas.**

Las plantas se cultivaron en suelos con distintos niveles de metal para lo cual fue necesario fortificar el suelo con Cd, Pb y Zn. En el caso de Cu, considerando que los tres suelos tienen altos niveles del elemento, se optó por hacer una comparación entre los suelos sin adición de metal.

##### **2.4.1. Preparación de suelos fortificados con cadmio, plomo y cinc.**

Con el fin de estudiar un rango más amplio de metal total en el suelo, se fortificaron distintas porciones de suelo Mapocho con Cd, Pb y Zn. Para ello, se prepararon cuatro bandejas, cada una con seis kilogramos de suelo. Se agregó una solución de cadmio, plomo o zinc, en forma de nitrato, para alcanzar una concentración alrededor de 15, 150 y 1000 mg/kg, respectivamente. El suelo fue mezclado y se dejó estabilizar por 6 semanas, a temperatura ambiente, manteniendo humedad constante. Se dejaron incubar por un periodo de



aproximadamente 6 semanas a temperatura ambiente ( $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), recuperando periódicamente la humedad perdida. Posteriormente, los suelos fueron secados, molidos y tamizados para su uso.

#### 2.4.2. Cultivo de plantas de lechuga.

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) corresponde a una de las hortalizas de mayor consumo a nivel nacional. Por lo tanto, se cultivó esta especie para los objetivos planteados en este estudio. Para ello, se cultivaron las semillas de la variedad costina sobre arena de río previamente lavada con agua destilada.

El ensayo se llevó a cabo considerando cuatro macetas por tratamiento de suelo. En cada maceta se puso 1,1 kilogramos de suelo tratado, los cuales se hidrataron con agua destilada hasta llegar a humedad de campo. En cuanto las plántulas lechuga alcanzaron cierto tamaño, se trasplantaron en una cantidad fija a las macetas. Paralelamente, como método de control, se prepararon macetas de menor tamaño conteniendo 550 gramos de cada suelo, en las cuales no se realizó cultivo, pero recibieron el riego y tratamiento proporcional a las demás macetas. El periodo de desarrollo del cultivo fue de 10 semanas. Durante el transcurso del cultivo, se aplicó una solución nutritiva para suplir la posible carencia de macronutrientes, compuesta por  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en concentraciones 1,27; 0,3; 0,27; 0,11; 0,33 y 0,2 mmol/L, respectivamente, con pH ajustado a 6.

Una porción de lechuga fresca se guardó para los estudios de fraccionamiento subcelular. El cultivo restante se cosechó, separando la parte aérea de las raíces. El material se secó en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 48 h, se molió en un molino para vegetales para los estudios posteriores y se almacenó.

### 2.4.3. Determinación de metal total en tejido vegetal.

Se pesaron 400 mg ( $\pm 0,1$  mg) de parte aérea o 200 mg ( $\pm 0,1$  mg) de raíz. Luego, la muestra se trasladó a vaso de teflón. Se agregó 4 mL de ácido nítrico al 69% y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Se agitó y deja reposar 10 minutos. Se instalan los vasos de teflón en horno microondas Milestone, modelo MLS 1200 Mega, aplicando el siguiente programa: 1 minuto a 250 W; 1 minuto a 0 W; 5 minutos a 250 W; 5 minutos a 400 W; 5 minutos a 650 W y 5 minutos de ventilación. Luego, se enfría el vaso por medio de baño de agua durante 30 minutos. Después, se traslada el líquido a un matraz de aforo de 25 mL. La solución resultante se filtró y almacenó. La muestra se analizó por EAA con llama.

### 2.5. Fraccionamiento subcelular de metal en plantas.

#### Procedimiento:

Antes de iniciar el procedimiento, se ambientó el material a 4°C. Luego, se congeló en un mortero 5 g ( $\pm 0,001$  g) de lechuga fresca con nitrógeno líquido y se molió rápidamente. Después, se vertió 12,5 mL de una solución buffer, la cual se compone de TRIS 50 mmol/L, sacarosa 250 mmol/L y ditioeritritol 1 mmol/L, ajustada a pH 7,5 (HCl) y ambientada a 4°C. Una vez que se formó una pasta homogénea, se filtró la mezcla resultante mediante malla filtradora sobre un embudo, cuyo vástago está inserto en un tubo de centrifuga de 50 mL previamente tarado. Se recolecta el pellet resultante en la malla. La suspensión resultante se centrifuga a 1.232 rpm x 5 min a 4°C. El sobrenadante se vertió en un vaso y el residuo obtenido se mezcló con el pellet obtenido en la malla. La mezcla de estos residuos corresponde a la pared celular (Fracción I). Después, se centrifugó el sobrenadante en un recipiente previamente tarado a 14.514 rpm durante 45 min a 4°C. Luego, se separó el sobrenadante del nuevo pellet resultante. Este último

corresponde a la fracción que contiene los organelos (Fracción II), mientras que el sobrenadante obtenido corresponde a la fracción que contiene al citoplasma y vacuolas (Fracción III).

## **2.6. Análisis estadístico**

Los valores informados en este trabajo corresponden a valores promedio obtenidos en triplicado o cuádruplicado. En algunos casos fue necesario aplicar la Prueba de Grubbs para descartar valores atípicos. Para establecer si hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los promedios de los distintos tratamientos, se aplicó la prueba  $t$  de Student o el análisis de varianza.

Para seleccionar las variables a aplicar en las ecuaciones de regresión múltiple, inicialmente los resultados se ingresaron a un programa de determinación de coeficiente de correlación simple ( $r$ ) y posteriormente se calculó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Si  $R^2 > 0,5$ , las variables eran seleccionadas por medio del valor  $p$ , para luego realizar una regresión lineal múltiple, de la cual se obtuvieron ecuaciones de regresión múltiple. El  $R^2$  y valor  $p$  de cada una de estas ecuaciones también fue registrado. El programa utilizado para la gestión de datos corresponde a Microsoft Office Excel 2007, además, en algunos casos se utilizó el software Statgraphics Centurion XV.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización fisicoquímica de suelos.

La caracterización fisicoquímica de los suelos seleccionados para este estudio se presenta en la Tabla 4. Estos suelos se eligieron por su cercanía a centros urbanos, lo que hace probable que en los próximos años sean considerados como suelos aptos para la construcción de viviendas. En general, los tres suelos presentan características fisicoquímicas dentro de los rangos descritos para la mayor parte de los suelos de la zona central (Luzio y col., 2010).

El pH en agua de los suelos Cauquenes y Mapocho se encuentra en el rango alcalino, en cambio en suelo Rancagua es cercano al neutro; sin embargo, el pH en KCl, el cual revela la acidez potencial de un suelo, indicaría que los tres suelos son más bien neutros o levemente ácidos. La diferencia  $\text{pH}_{\text{agua}} - \text{pH}_{\text{KCl}}$  en los tres suelos fue alrededor de una unidad, indicando que estos suelos tienen baja saturación de los sitios por  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ . Por su parte, la conductividad eléctrica de los tres suelos fue baja, indicando un bajo contenido de sales disueltas. En relación a la composición textural de los suelos, en Cauquenes y Mapocho predomina la fracción arena, a diferencia del suelo Rancagua donde predomina la fracción limo. Los tres suelos presentan niveles de cobre sobre la media descrita para suelos de esta zona; sin embargo, otros elementos traza de importancia ambiental se encuentran dentro de rangos normales. (Luzio y col., 2010)

Tabla 4: Caracterización fisicoquímica de suelos de Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

		CAUQUENES	RANCAGUA	MAPOCHO
pH (Agua)		8,0 <sup>a</sup> ± <0,1	6,7 ± 0,1	8,1 ± 0,1
pH (KCl)		6,9 ± <0,1	5,5 ± 0,1	7,1 ± 0,1
Conductividad	dS/m	0,92 ± 0,1	2,6 ± 0,1	0,96 ± 0,08
Carbono orgánico	%	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,1 ± <0,1
Materia orgánica	%	2,4 ± 0,2	4,4 ± 0,4	3,6 ± 0,1
CIC <sup>b</sup>	cmol/kg	14 ± <0,1	21 ± <0,1	34 ± 1
Textura	Clasificación	Franco arenoso	Limoso	Franco arenoso
Arena	%	61 ± 3	38 ± 1	55 ± 1
Limo	%	27 ± 3	40 ± 2	28 ± 1
Arcilla	%	12 ± <0,1	23 ± 1	17 ± <0,1
Contenido de metal total		mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd		nd <sup>c</sup>	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,3
Cr		21 ± 1	32 ± 1	139 ± 1
Cu		2057 ± 29	1309 ± 36	640 ± 2
Mn		944 ± 7	693 ± 12	1154 ± 13
Ni		28 ± 1	31 ± 0	45 ± 2
Pb		28 ± 3	33 ± 1	50 ± 2
Zn		198 ± 26	185 ± 15	362 ± 17
Contenido de metal total		g/kg	g/kg	g/kg
Ca		8,0 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Fe		54 ± <0,1	46 ± 1	46 ± 1
Mg		0,40 ± 0,05	1,7 ± 0,5	2,7 ± 0,2

a: promedio ± desviación estándar; b: CIC: capacidad de intercambio catiónico; c: n.d.: no detectado

### 3.2. Disponibilidad de metales mediante métodos de extracción simple.

La cantidad de metal disponible mediante extracción simple se presenta en la tabla 5. De los extractantes usados, la mayor cantidad de metal liberado se obtuvo, en general, con compuestos que poseen capacidad quelante de metales. Entre estos, los ácidos orgánicos de cadena corta fueron más efectivos que el DTPA; la capacidad para extraer metal desde el suelo se presentó en el orden: ac. tartárico > ac. cítrico > ac. acético > DTPA >> agua > CaCl<sub>2</sub>. En el caso del cobre, la comparación entre los agentes quelantes señala que los rangos de metal extractable

están entre 260-1219 mg/kg, 178-539 mg/kg y 7,3-91 mg/kg, para los suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho, respectivamente; por el contrario, agua y CaCl<sub>2</sub> extrajeron una escasa cantidad de metal, menor en alrededor de dos órdenes de magnitud que la concentración encontrada para agentes quelantes; una tendencia similar se obtuvo para los otros metales traza.

Tabla 5: Contenido de metal disponible (mg/kg) mediante extracción simple.

	<b>CAUQUENES</b>	<b>RANCAGUA</b>	<b>MAPOCHO</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	nd <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup> ± 0,04	nd
Cu	7,9 ± 3,5	5,2 ± 1,8	4,8 ± 1,3
Pb	nd	nd	nd
Zn	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,6	3,0 ± 0,8
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	nd	nd	nd
Cu	2,1 ± 0,8	2,0 ± 0,1	0,44 ± 0,09
Pb	nd	nd	nd
Zn	0,53 ± 0,07	0,68 ± 0,01	0,29 ± 0,02
<b>DTPA</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,31 ± <0,1
Cu	260 ± 5	311 ± 2	62 ± 1
Pb	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,8 ± 1,4
Zn	2,3 ± 0,1	4,9 ± 0,1	27 ± 10
<b>Ácido acético</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	nd	nd	0,64 ± 0,09
Cu	574 ± 21	178 ± 2	7,3 ± 0,1
Pb	nd	nd	nd
Zn	18 ± 1	12 ± 1	22 ± 2
<b>Ácido cítrico</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	nd	nd	0,78 ± 0,04
Cu	1217 ± 12	519 ± 12	88 ± 1
Pb	nd	nd	nd
Zn	31 ± 1	26 ± <0,1	88 ± 6
<b>Ácido tartárico</b>	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Cd	nd	nd	nd
Cu	1219 ± 13	539 ± 9	91 ± 2
Pb	nd	nd	nd
Zn	33 ± 1	28 ± 1	95 ± 1

a: n.d., no detectado; b: promedio ± desviación estándar

### 3.3. Contenido de metal total en suelos incubados

El contenido de metal total en los suelos incubados se presenta en la tabla 6. La fortificación del suelo Mapocho con Cd, Pb y Zn significó un incremento de alrededor de 3 veces la cantidad original de metal en los suelos.

Tabla 6: Contenido de metal total (mg/kg) en suelos de Cauquenes, Rancagua y Mapocho fortificados con metal.

	Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
Cd	2,9 <sup>a</sup> ± 0,4	2,7 ± 0,2	3,8 ± 0,1	16 ± 1	---	---
Cr	28 ± 0	26 ± 1	134 ± 3	---	---	---
Cu	2057 ± 29	1309 ± 36	640 ± 2	---	---	---
Ni	28 ± 1	31 ± 0	45 ± 2	---	---	---
Pb	28 ± 3	33 ± 1	50 ± 2	---	146 ± 3	---
Zn	175 ± 18	186 ± 7	336 ± 30	---	---	1096 ± 39

a: promedio ± desviación estándar

De acuerdo a las normativas de referencia para concentraciones aceptables de metales en el suelo, y tomando en cuenta las directivas de Kelley para clasificación de suelos contaminados en la Unión Europea (Tabla 1, Anexos), los suelos de Cauquenes y Rancagua corresponderían a suelos con contaminación media por cobre, ya que presentan una concentración de Cu disponible en el rango 200-500 mg/kg (SAG, 2005). En el caso de Mn, considerando su concentración total en el rango 500-1000 mg/kg, los suelos de Cauquenes y Rancagua tendrían una contaminación ligera por Mn, en tanto que el suelo Mapocho tendría una contaminación media (1000-2000 mg/kg) por este elemento. Respecto de Cd, los suelos de Rancagua y Mapocho presentan contaminación ligera (1-3 mg/kg), en tanto que para Cr, sólo el suelo Mapocho presenta contaminación ligera por este elemento (100-200 mg/kg). El grado de contaminación del suelo Mapocho se incrementó de ligero a alto al fortificar el suelo con Cd y Zn, en tanto que no modificó su clasificación al fortificar con Pb.

### **3.4. Extracción secuencial de metales.**

Las Figuras 2 y 3 (Tablas 2 y 3, anexos) presentan la distribución de Cd, Cu, Pb y Zn en distintas formas químicas en el suelo, al igual que la distribución de Cr y Ni, elementos esenciales que originalmente no habían sido considerados en este estudio.

El cobre en los suelos de Cauquenes y Rancagua tiende a distribuirse proporcionalmente en las cuatro fracciones, no así en el suelo Mapocho donde el 70% del metal está en forma residual.

El cadmio en los suelos Cauquenes y Mapocho se distribuyó en las cuatro fracciones, pero con predominio de la fracción residual con un 44% promedio. En el suelo Rancagua se observaron sólo las fracciones de metal unido a materia orgánica y residual con 32 y 68%, respectivamente. La fortificación del suelo Mapocho con cadmio cambió la distribución del metal, predominando ahora las fracciones de metal intercambiable y unido a la fracción reducible (Figura 3) con 28 y 52%, respectivamente.

El cromo en los suelos de Cauquenes y Rancagua se encuentra en un 100% en la fracción residual, en cambio en suelo Mapocho se encuentra principalmente unido a materia orgánica y residual con 66 y 33%, respectivamente, lo que es una respuesta común del Cr en los procedimientos de extracción secuencial (Elzinga y Cirimo, 2010; Papassiopi y col, 2009).

El níquel, en general, se une preferentemente a la fracción residual, presentando un contenido de metal en esta fracción entre 65 y 85%.

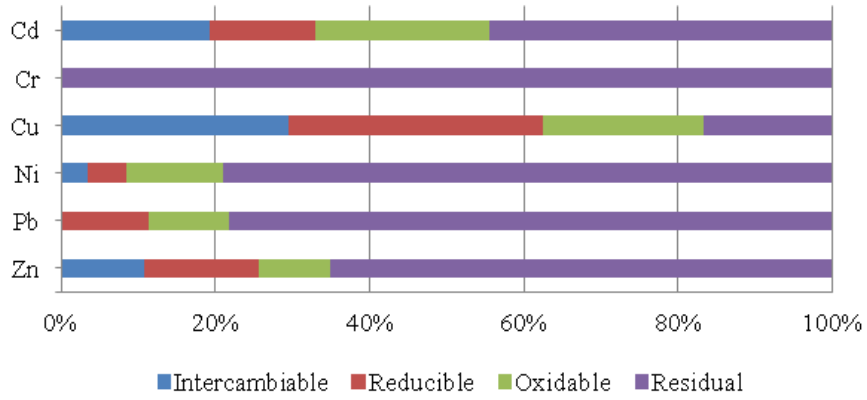
El plomo en los tres suelos se presenta sobre un 70% unido a la fracción residual y escaso o nulo contenido en la fracción intercambiable. La fortificación del suelo Mapocho con plomo



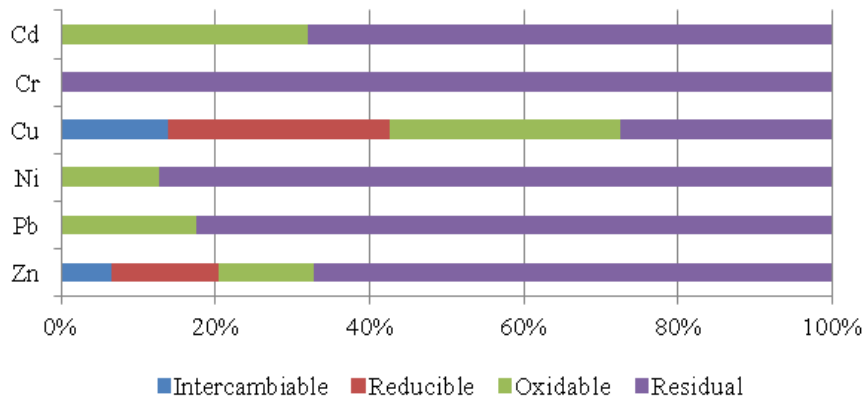
incrementa el elemento en la fracción reducible y en la fracción de metal unido a materia orgánica, con una consecuente disminución de la fracción residual.

El cinc presentó una distribución similar en los tres suelos, uniéndose preferentemente a la fracción residual (55-65%) y en cantidades equitativas a las otras tres fracciones. La fortificación de suelo Mapocho con cinc cambió notoriamente la distribución, con incremento de la fracción intercambiable y reducible, mantenimiento de la fracción oxidable y disminución de la fracción residual.

### Suelo Cauquenes



### Suelo Rancagua



### Suelo Mapocho

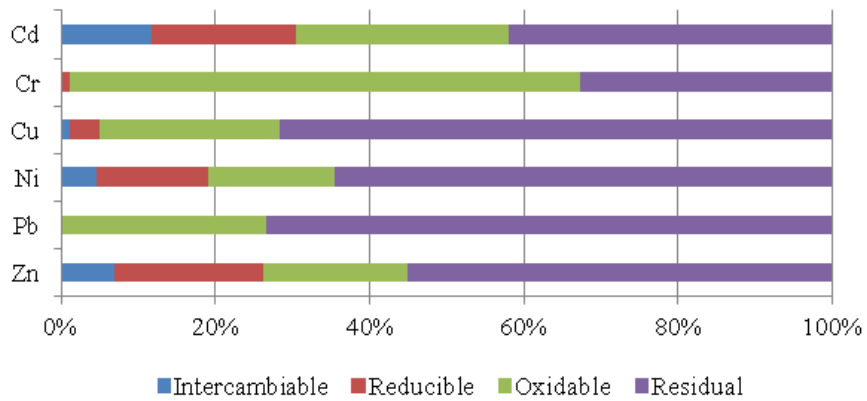


Figura 2: Distribución de formas químicas de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los suelos no fortificados con metal.

### Suelo Mapocho fortificado

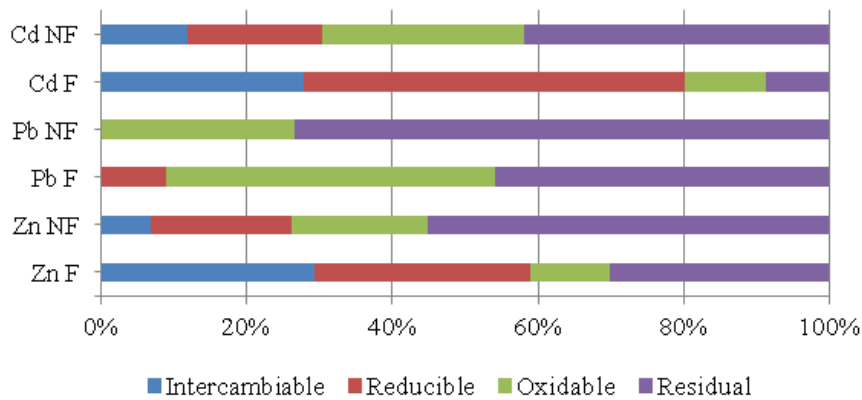


Figura 3: Distribución de formas químicas de Cd, Pb y Zn en suelo Mapocho fortificado (F) individualmente con cada metal y suelo no fortificado (NF).

### 3.5. Bioaccesibilidad de metales en suelos.

#### 3.5.1. Bioaccesibilidad de metales mediante glicina.

Las Figuras 4 y 5 (Tabla 4, anexos) presentan los resultados de bioaccesibilidad en suelos.

El cadmio fue detectado sólo en el suelo Mapocho fortificado con este metal, mostrando mayor tendencia a solubilizarse en la fase gástrica, donde alcanzó 15 mg/kg (93%), en comparación a la fase intestinal donde la concentración fue de 8 mg/kg (65%).

El cromo en los suelos de Cauquenes y Rancagua fue bioaccesible sólo en la fase intestinal, ambos con concentraciones de 14 mg/kg (50-53%), en cambio en suelo Mapocho fue bioaccesible en ambas fases con concentraciones en el rango 18-25 mg/kg, con predominio de la fase intestinal.

El cobre fue bioaccesible en ambas fases en los tres suelos, siendo levemente predominante la fase gástrica. En los suelos Cauquenes y Rancagua la concentración bioaccesible

estuvo en el rango 541 – 1176 mg/kg (47-57%), en cambio en suelo Mapocho se presentó en el rango 149 - 165 mg/kg (25-26%).

El níquel en los suelos Cauquenes y Rancagua fue bioaccesible sólo en la fase gástrica, con concentraciones en el rango 14 - 15 mg/kg, que representan alrededor del 50%. En el suelo Mapocho fue bioaccesible en la fase gástrica e intestinal, con concentraciones de 20 (44%) y 8,4 (21%) mg/kg, respectivamente.

El Pb en los tres suelos fue bioaccesible sólo en la fase gástrica con concentraciones entre 15 y 27 mg/kg. La fortificación de suelo Mapocho con este metal elevó la concentración bioaccesible a 112 mg/kg (77%), pese a ello el metal no fue bioaccesible en la fase intestinal.

El Zn fue bioaccesible en ambas fases, con predominio de la fase gástrica. En los tres suelos la concentración bioaccesible no superó los 71 mg/kg (21%). En el suelo Mapocho fortificado con este metal, la concentración bioaccesible en las fases gástrica e intestinal incrementó a 770 y 520 mg/kg, respectivamente (70% y 57%).

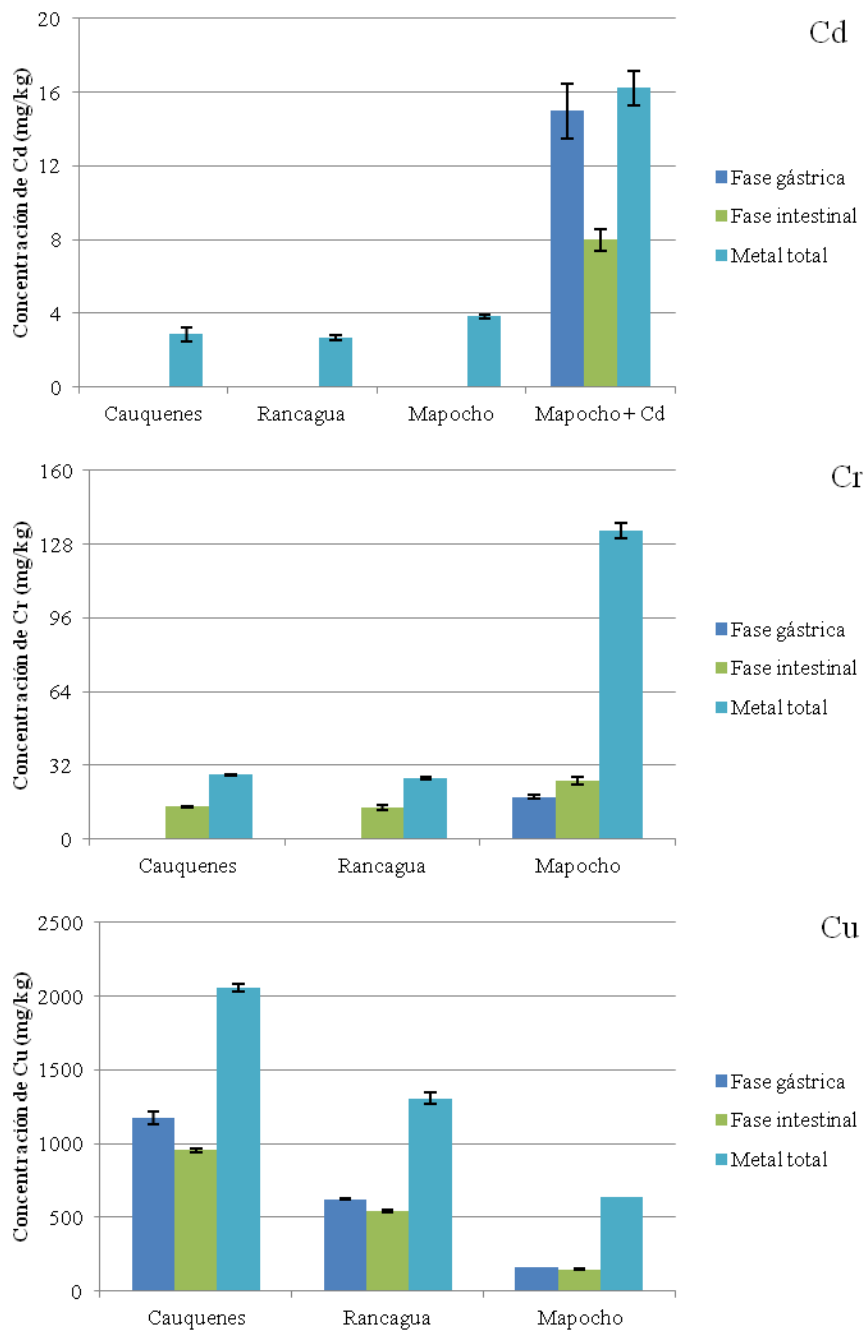


Figura 4: Concentración de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

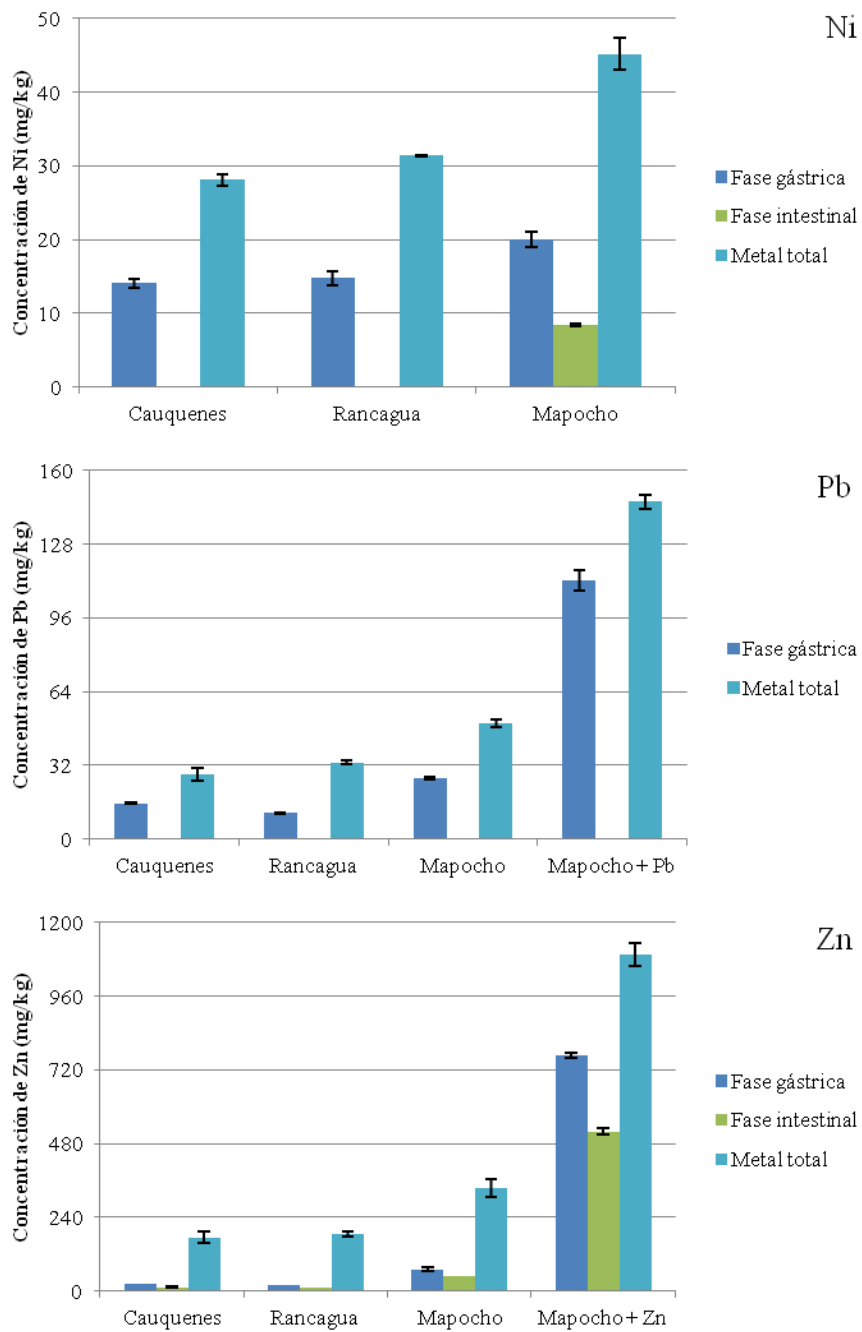


Figura 5: Concentración de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

### 3.5.2. Bioaccesibilidad en suelos mediante sustituto de fluido gastrointestinal.

Las Figuras 6 y 7 (Tabla 5, anexos) presentan los resultados de bioaccesibilidad en suelos.

El Cd fue bioaccesible sólo en el suelo Mapocho fortificado, presentando concentraciones de 13 y 4 mg/kg (79 y 33%) en la fase gástrica e intestinal, respectivamente.

El Cr fue bioaccesible solamente en suelo Mapocho, con concentraciones de 15 y 9,9 mg/kg (11 y 7,8%) en la fase gástrica e intestinal, respectivamente.

El Cu fue bioaccesible en ambas fases en los tres suelos, predominando la concentración en la fase gástrica sobre la intestinal. En suelos Cauquenes y Rancagua el contenido de metal bioaccesible varió entre 320-1218 mg/kg (30-59%), mientras que en suelo Mapocho, entre 94-164 mg/kg (17-26%).

El Ni fue bioaccesible solamente en suelo Mapocho y únicamente en la fase gástrica, con un contenido de 11 mg/kg (24%).

El Pb fue detectado exclusivamente en la fase gástrica en suelo Mapocho, con un contenido es de 11 mg/kg (21%). La fortificación de este suelo produjo un aumento discreto a 14 mg/kg (10%) en el contenido de Pb.

El Zn fue bioaccesible en todos los suelos en ambas fases, pero predominando en la fase gástrica. La concentración bioaccesible estuvo en el rango 9 – 89 mg/kg (3% - 26%). En el suelo Mapocho fortificado la concentración bioaccesible en las fases gástrica e intestinal incrementó a 749 y 105 mg/kg, respectivamente (68 y 11%).

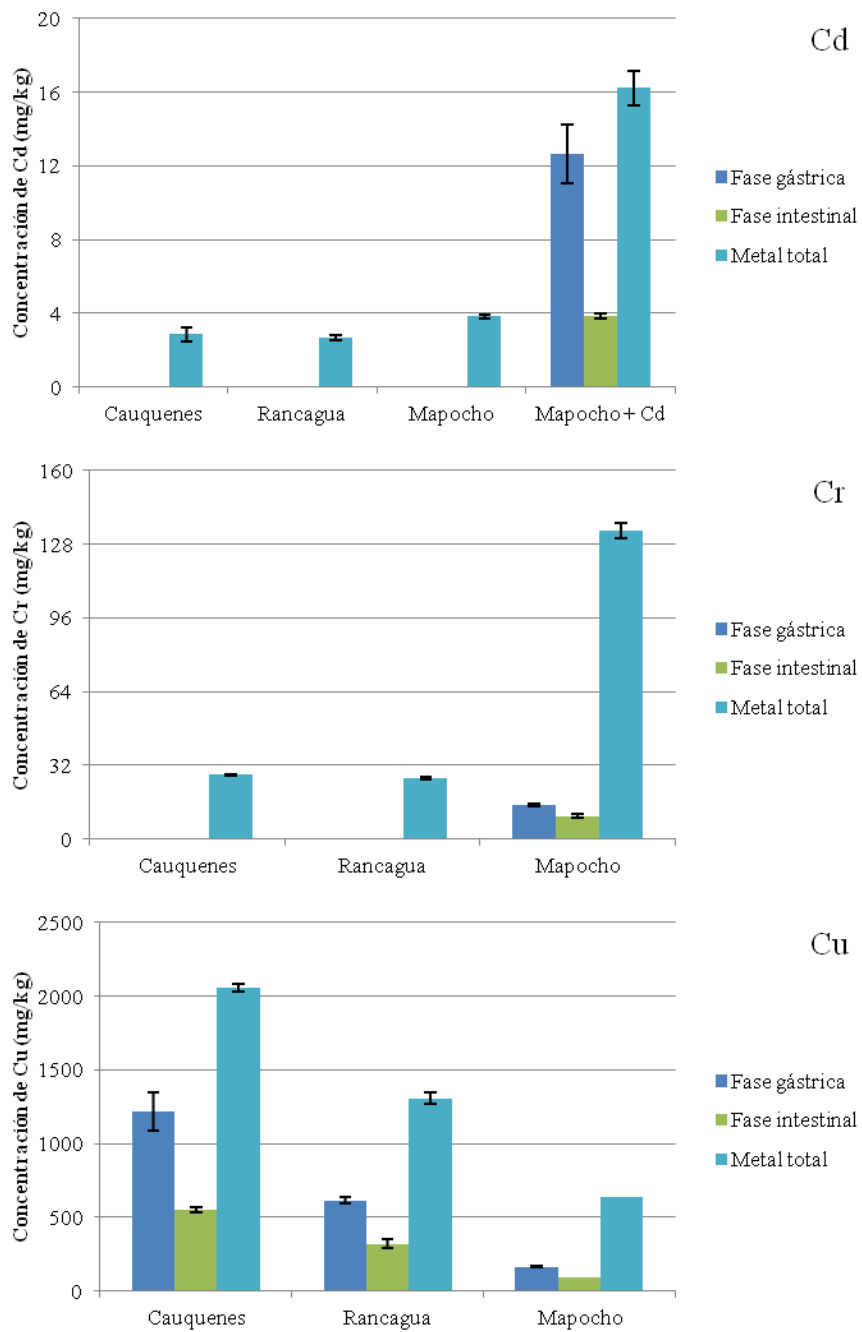


Figura 6: Concentración de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho.



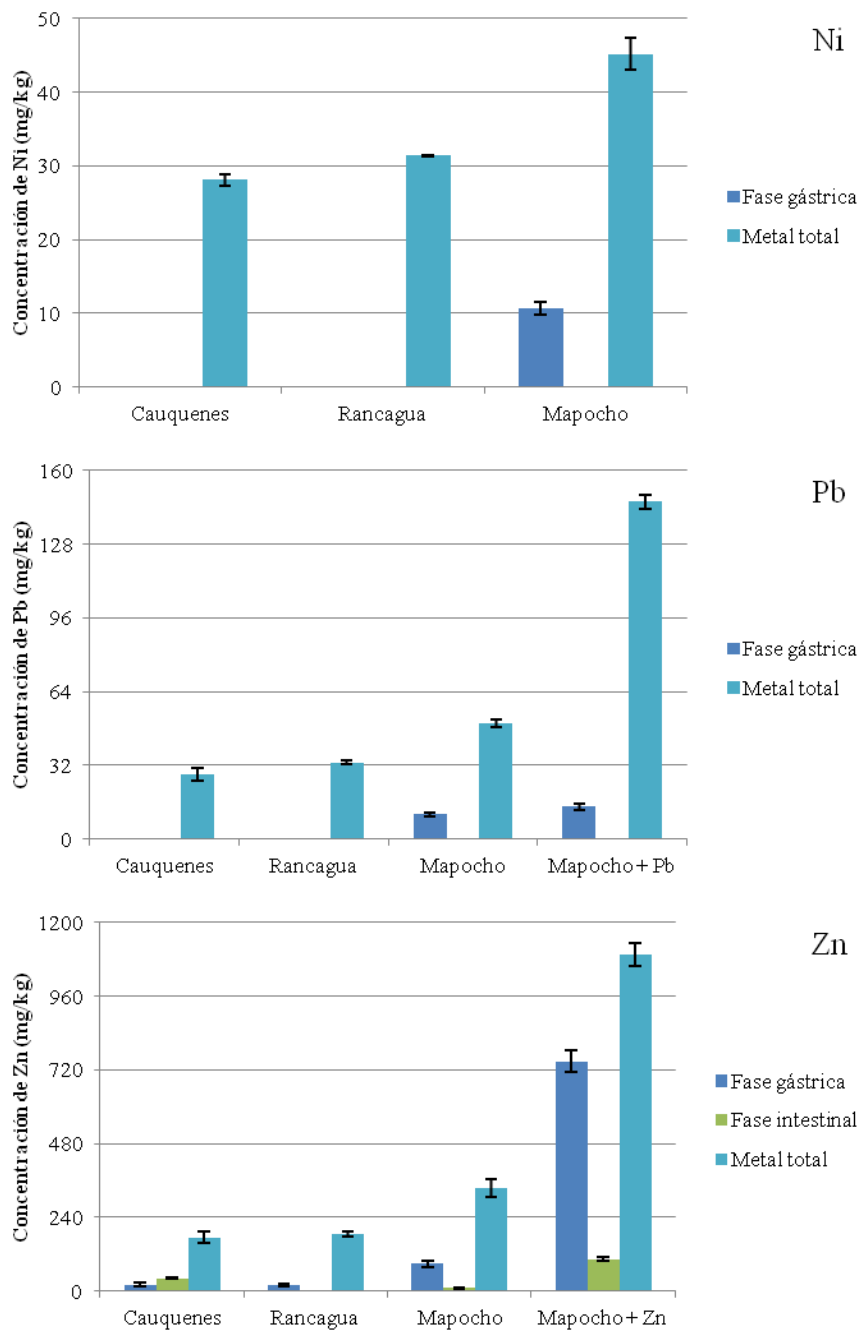


Figura 7: Concentración de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

### 3.5.3. Bioaccesibilidad en suelos cultivados y no cultivados.

A modo de establecer la influencia de la rizósfera sobre la bioaccesibilidad de los elementos, se determinó la concentración bioaccesible en los suelos cultivados y no cultivados del ensayo. Los resultados se presentan en las Figuras 8 y 9 (Tabla 6, anexos).

En general la concentración bioaccesible de todos los metales, tanto en fase gástrica como intestinal, no cambio significativamente entre suelos cultivados y no cultivados (control), excepto en el caso de Cu donde la concentración en la fase intestinal se incrementa con el cultivo de 893 a 950 mg/kg y de 488 a 517 mg/kg en los suelos Cauquenes y Rancagua, respectivamente. Esto implicaría que el ambiente rizosférico estaría facilitando la formación de especies más lábiles de Cu, probablemente debido a la exudación de compuestos, tales como ácidos orgánicos de cadena corta que complejarían el metal en la zona rizosférica (Feng, 2005b).

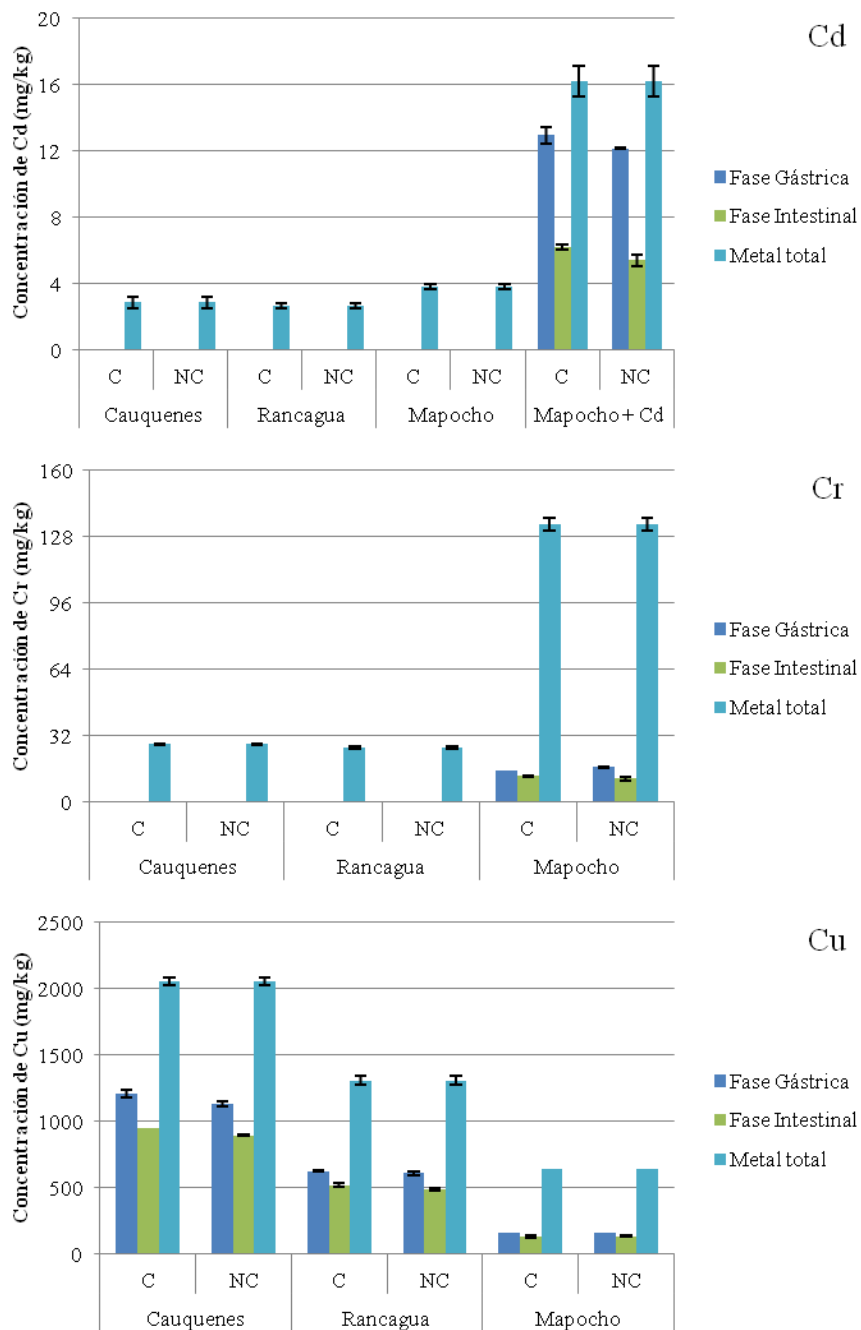


Figura 8: Concentración de Cd, Cr y Cu bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados (C) y no cultivados (NC).

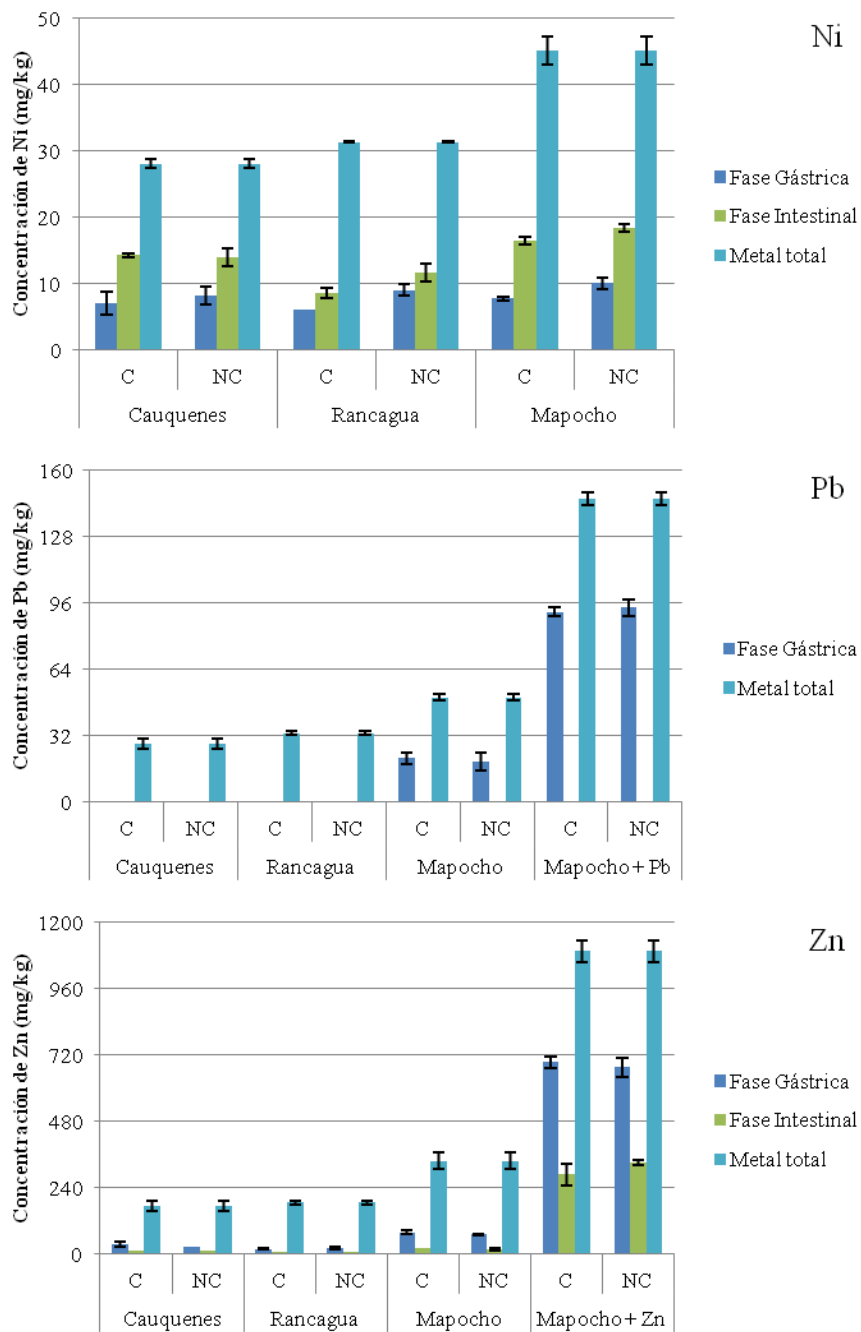


Figura 9: Concentración de Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados (C) y no cultivados (NC).

### 3.6. Biomasa del cultivo de lechuga

Al final del periodo de cultivo se pudo observar diferencias, tanto en la altura de las plantas como la cantidad de biomasa obtenida con los distintos tratamientos. La Tabla 7 muestra los valores de biomasa obtenida. No se observa una tendencia clara que permita asociar la biomasa a algún efecto de toxicidad por los metales presentes en el suelo; sin embargo, la mayor biomasa de parte aérea obtenida con el tratamiento con Zn, podría corresponder a un efecto del nitrógeno (macronutriente) aportado por el  $Zn(NO_3)_2$  agregado para incrementar la concentración de este elemento en el suelo fortificado, como se puede observar en la Figura 10.

Tabla 7: Biomasa en base seca (g/maceta) de material vegetal obtenido de cultivos con distintos tratamientos.

Tratamiento	Biomasa Hoja (g/maceta)	Biomasa Raíz (g/maceta)
Cauquenes	3,5 ± <0,1	1,3 ± 0,1
Rancagua	5,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Mapocho	2,9 ± 0,9	0,6 ± 0,1
Mapocho + Cd	5,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1
Mapocho + Pb	2,7 ± 0,3	0,8 ± 0,1
Mapocho + Zn	13 ± <0,1	2,0 ± 0,3

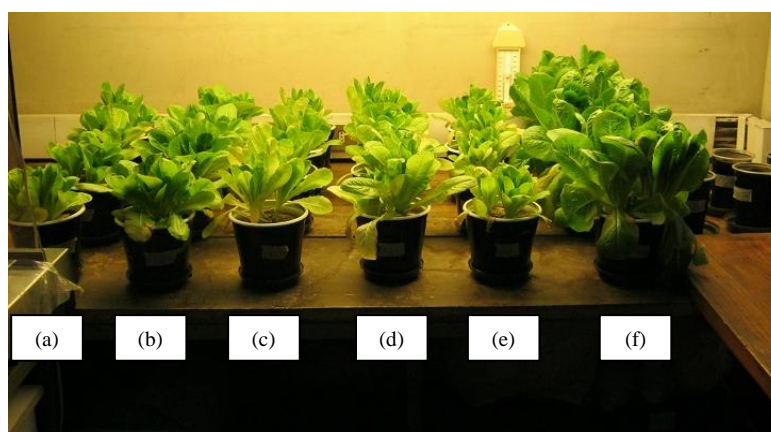


Figura 10: Cultivo de lechugas en suelos (a) Cauquenes, (b) Rancagua, (c) Mapocho y fortificación de suelo Mapocho con (d) Cd, (e) Pb y (f) Zn.

### 3.7. Biodisponibilidad de metales en suelos.

La biodisponibilidad de metales en los suelos en estudio se evaluó mediante el cultivo de lechuga. Los resultados se muestran en la Figura 11 (Tabla 7, anexos).

En general, la concentración en la raíz de la planta fue 10, 25, 9 y 2 veces mayor que la concentración en la parte aérea para Cr, Cu Ni y Zn, respectivamente.

El Cd fue detectado sólo en suelo fortificado con el metal y a diferencia de los otros elementos su concentración fue mayor en un 37% en la parte aérea en comparación a la raíz, implicando que este elemento es traslocado de manera importante a la parte aérea. Dicho fenómeno se ha observado en estudios previos (Mehmood y col, 2013; Jarvis y col, 1976)

El Cr en hojas presentó una concentración de alrededor de 3 mg/kg en las plantas crecidas en los tres suelos. En la raíz el rango de concentraciones fue de 7,6-17 mg/kg. Esto puede correlacionarse con el contenido de Cr total del suelo, con un coeficiente de correlación para parte aérea y raíz de 0,643 ( $p = 0,01$ ) y 0,772 ( $p = 0,01$ ), respectivamente.

El Cu en la parte aérea de plantas cultivadas en los tres suelos no superó los 16 mg/kg y no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Por otra parte, la concentración en la raíz se presentó en el rango 100-400 mg/kg, diferenciándose notoriamente los suelos Cauquenes y Rancagua con 398 y 352 mg/kg, respectivamente, del suelo Mapocho con 96 mg/kg. Las concentraciones en la raíz correlacionaron directamente con el contenido total de Cu en los suelos ( $r = 0,951$ ,  $p = 0,01$ ).

El Ni no fue detectado en las hojas de plantas cultivadas en el suelo Cauquenes, pero sí en la raíz, en una concentración de 8,5 mg/kg. Para los suelos Rancagua y Mapocho, el contenido de metal en las hojas y las raíces obtuvo un rango entre 5-8 y 13-17 mg/kg, respectivamente.

El Zn presentó un contenido entre 21 y 47 mg/kg en la parte aérea de las plantas cultivadas en los tres suelos, mientras que en la raíz, su contenido estuvo entre 40 y 66 mg/kg. En

suelo fortificado con este elemento, se observó un aumento en el contenido de metal biodisponible en la hoja y raíz, con 121 y 373 mg/kg, respectivamente. En ambas partes de la planta el metal correlacionó positivamente con el contenido total de metal en el suelo, siendo el coeficiente de correlación en la parte aérea de 0,991 ( $p = 0,03$ ), mientras que en la raíz, 0,981 ( $p = 0,02$ ).

Finalmente, Pb no fue detectado ni en la hoja ni en la raíz de las plantas cultivadas en los distintos suelos.

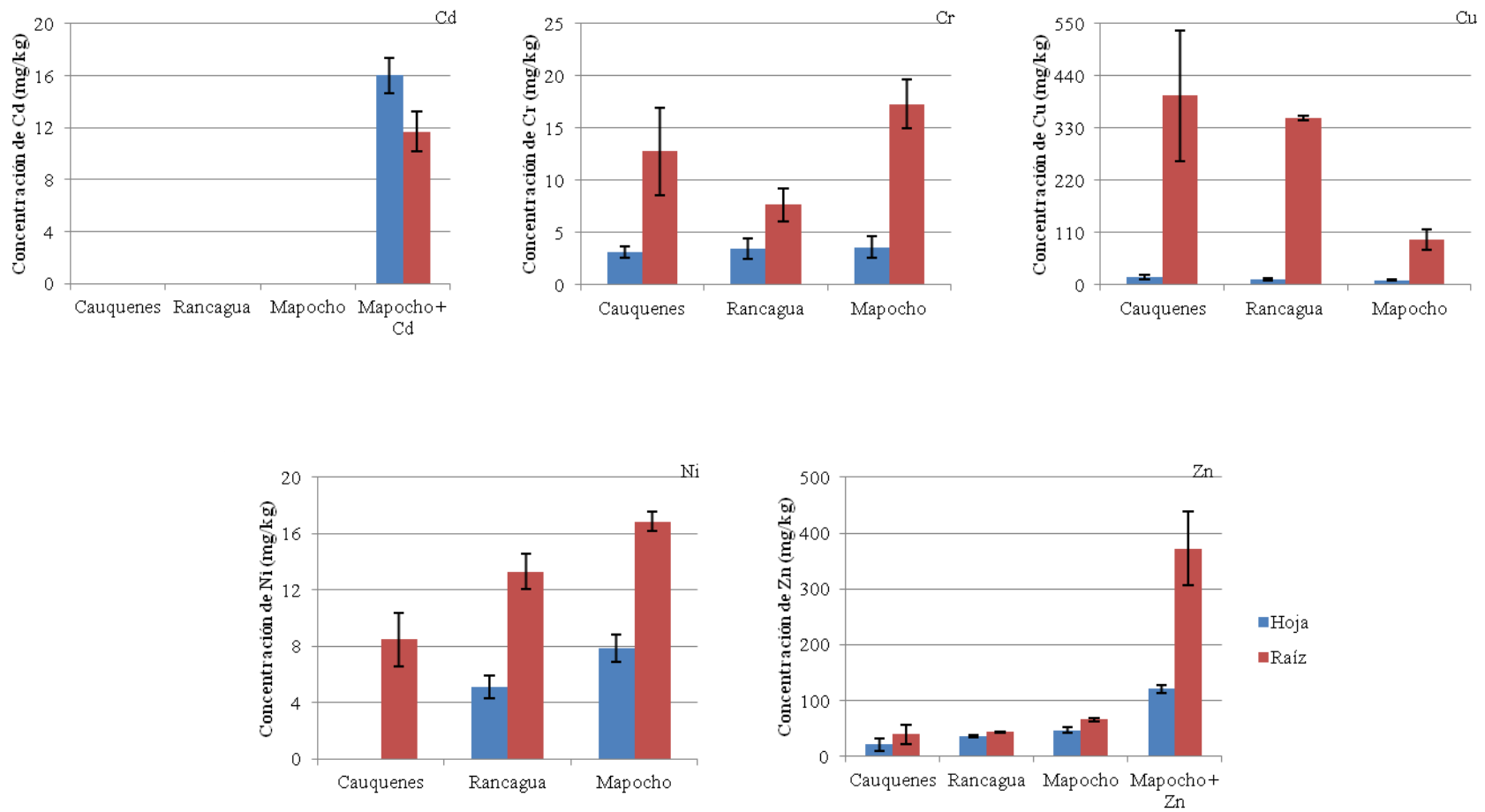


Figura 11: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn total (mg/Kg) en parte aérea y raíz de lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho.



### **3.8. Fraccionamiento subcelular.**

La Figura 12 (Tabla 8, anexos) presenta los resultados del fraccionamiento subcelular en las hojas de lechuga. De los cuatro elementos en estudio, Cu y Zn fueron detectados en las tres fracciones, pared celular, organelos y citoplasma, de las hojas de plantas cultivadas en los tres suelos. Cadmio sólo fue detectado en plantas cultivadas en suelo fortificado con el metal, en tanto Pb no fue detectado en ninguno de los tratamientos.

El Cd se asoció preferentemente a la pared celular presente en el tejido vegetal, con un contenido de 8,0 mg/kg (50%); mientras que en los organelos y en la fracción soluble presentó contenidos de metal en el rango 3,6-4,3 mg/kg (23-27%), sin diferencias significativas.

El Cu mostró una tendencia a acumularse en la fracción soluble del tejido vegetal en plantas cultivadas en suelos Mapocho y Rancagua (3,4-4,3 mg/kg), mientras que en el suelo Cauquenes presentó una tendencia hacia la pared celular (3,8 mg/kg).

El Zn presentó una distribución aproximadamente uniforme entre las tres fracciones de tejido vegetal, con rangos de 8-9, 7-9 y 11-17 mg/kg, en plantas cultivadas en suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho, respectivamente. En el suelo fortificado con dicho metal, predominó la fracción soluble sobre la de organelos y pared celular, presentando una concentración de 52, 19 y 21 mg/kg, respectivamente. Esto implicó un aumento en 25 puntos porcentuales del metal soluble y disminución en 7 y 18 puntos para organelos y pared celular, respectivamente.

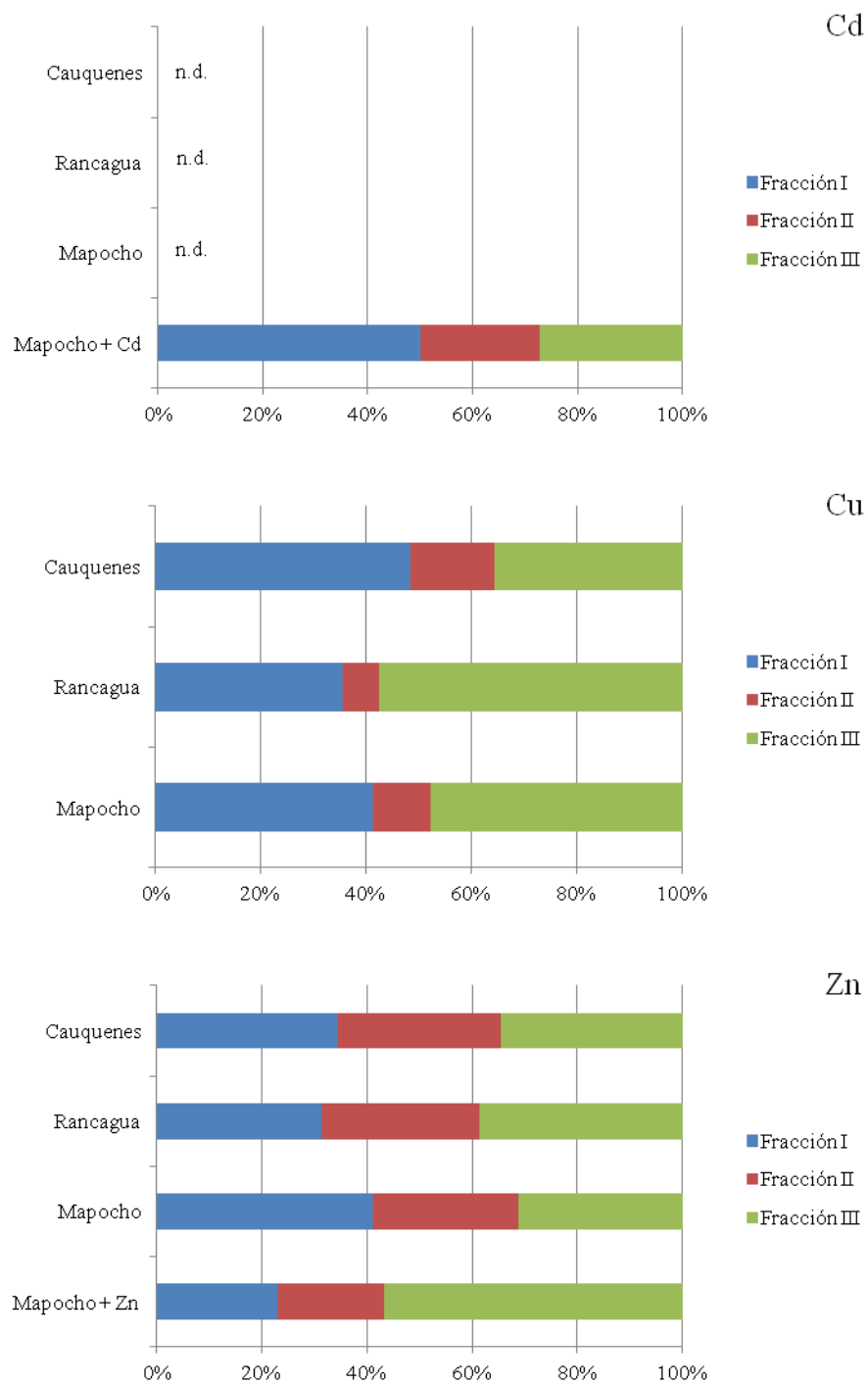


Figura 12: Concentración de Cd, Cu y Zn (%) en pared celular (Fracción I), organelos (Fracción II) y citoplasma (Fracción III) del tejido vegetal aéreo de lechuga cultivada en distintos suelos. nd = no detectado

### **3.9. Bioaccesibilidad de metales en lechuga determinada mediante glicina.**

La Figura 13 presenta los resultados de las pruebas de bioaccesibilidad realizadas mediante glicina (Tabla 9, anexos). En general, los resultados de bioaccesibilidad en hojas de lechuga fueron más dispersos que los valores de bioaccesibilidad en suelo. Esto se debe principalmente, a que en este estudio cada unidad experimental (maceta) aportó un dato de bioaccesibilidad y por lo tanto el resultado tiende a reflejar la alta variabilidad que se da frecuentemente en ensayos de tipo biológico, particularmente en el valor de concentración de un metal entre cada una de las unidades experimentales, que componen cada tratamiento.

Con respecto a los resultados de los metales involucrados, el Cd es altamente bioaccesible en la fase gástrica, en comparación a la fase intestinal. Los resultados permiten inferir que gran parte del Cd en la hoja de lechuga es bioaccesible en el estómago (16 mg/kg), valor que disminuye al 51% una vez que ingresa al intestino, este efecto puede estar relacionado al cambio notorio en pH que hay al pasar desde una fase a la otra. Con respecto a la fracción bioaccesible de Cu, éste presentó una concentración similar entre ambas fases para los suelos Cauquenes, Rancagua y Mapocho, con rangos de 8-11, 7-9 y 6-7 mg/kg, respectivamente. Con respecto al Zn, el metal presentó valores cercanos entre sí en ambas fases, con valores alrededor de 11 mg/kg para plantas en suelo Cauquenes y en el rango 24-27 mg/kg para plantas en suelo Rancagua. En el cultivo sobre suelo Mapocho, se observa una tendencia del metal hacia la fase gástrica con 40 mg/kg (86%), lo que se reafirma en el cultivo sobre suelo fortificado, donde la respuesta fue similar, con una concentración de 109 mg/kg (90%). Los elementos Cr, Ni y Pb, no fueron detectados en los extractos obtenidos en este experimento.

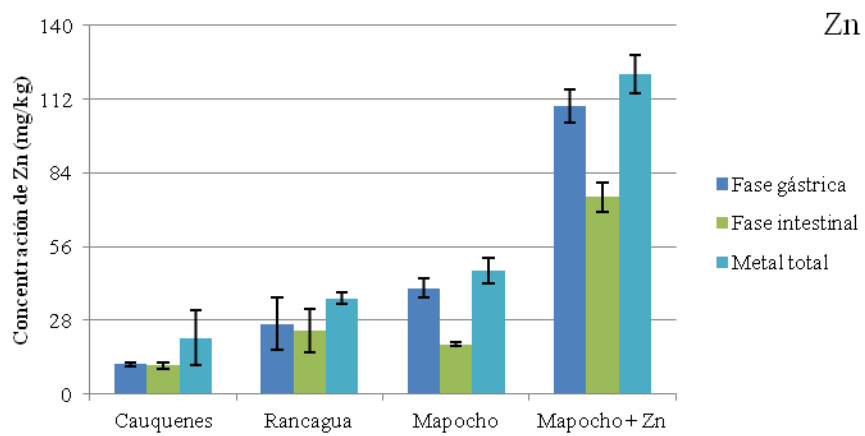
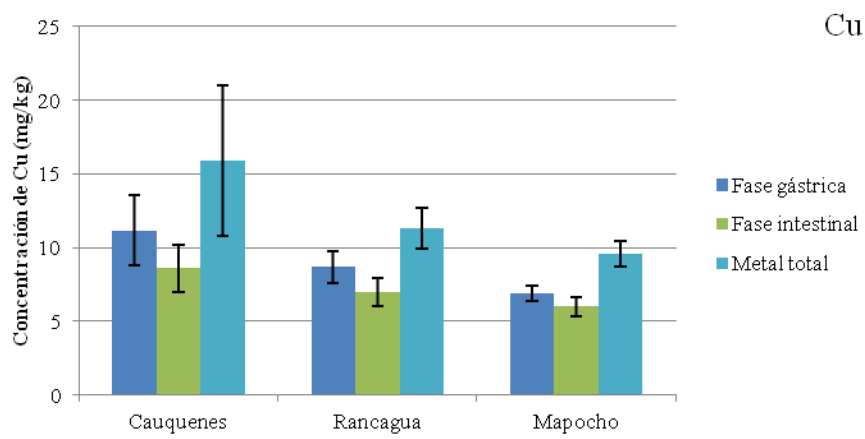
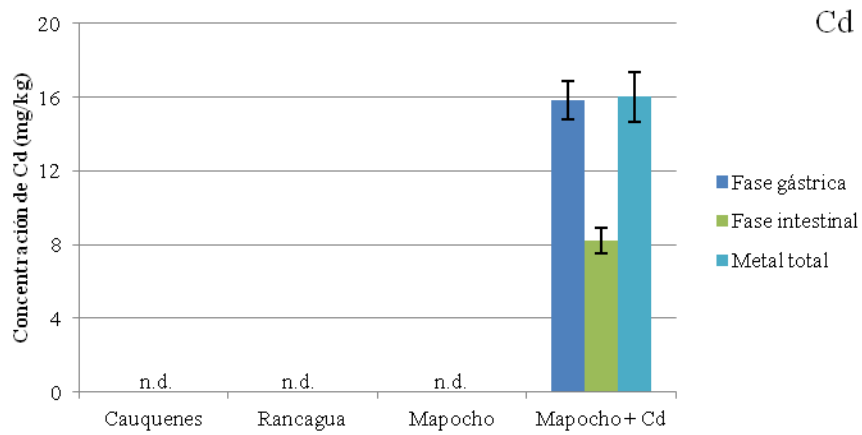


Figura 13: Concentración de Cd, Cu y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante glicina en lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

### **3.10. Bioaccesibilidad de metales en lechuga determinada mediante extracción con fluido gastrointestinal.**

La Figura 14 presenta los resultados de las pruebas de bioaccesibilidad realizadas mediante fluido gastrointestinal (Tabla 10, anexos).

Al usar fluidos compuestos por enzimas del tracto digestivo, las concentraciones de la fracción bioaccesible de elementos fueron en general similares a las obtenidas con glicina, es decir, se obtuvo una concentración máxima de 110 mg/kg para Zn y 16 mg/kg para Cd y Cu, siendo el Cd sólo detectado en suelo fortificado con el metal. Con enzimas este elemento fue bioaccesible en la fase gástrica en cantidad de 18 mg/kg (~100%) y en la fase intestinal con 5,9 mg/kg (37%). El Cu mostró rangos similares en las dos fases en plantas cultivadas en Cauquenes, Rancagua y Mapocho, con concentraciones promedio de 8,3 (50-54%), 6,5 (57-58%) y 7,7 mg/kg (75-86%), respectivamente. El Zn se distribuyó equitativamente entre las dos fases en las plantas cultivadas en suelos Cauquenes y Mapocho, con rangos de 26-39 mg/kg y 30-33 mg/kg, respectivamente; en cambio, en los suelos Rancagua y Mapocho fortificado presentó una tendencia a la fase gástrica, con contenidos de 44 y 111 mg/kg, respectivamente (100% y 92%).

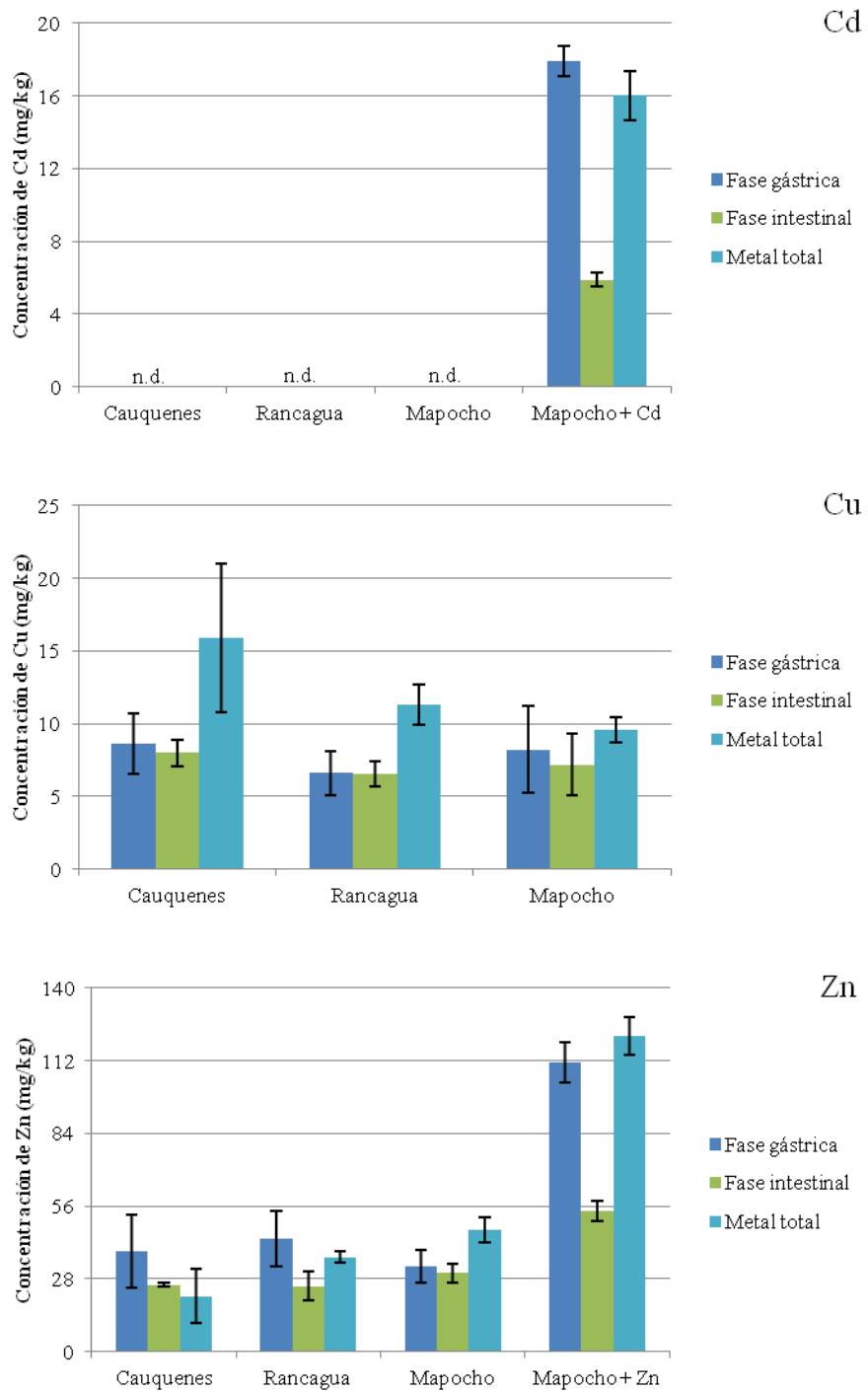


Figura 14: Concentración de Cd, Cu y Zn bioaccesible (mg/kg) mediante fluido gastrointestinal en lechuga cultivada en suelo Cauquenes, Rancagua y Mapocho.

### 3.11. Regresión múltiple.

Las tablas 8 y 9 presentan los resultados de correlación múltiple entre la concentración bioaccesible de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn y varias variables independientes consideradas en el estudio. Las correlaciones se evaluaron usando los datos de bioaccesibilidad encontrados con el extractante glicina.

#### 3.11.1. Regresión múltiple para la concentración bioaccesible de metales en suelos.

Los resultados de estas correlaciones se presentan en la tabla 8. En este grupo de correlaciones el  $R^2$  estuvo en el rango 0,96-0,99; siendo en todos los casos altamente significativas ( $p < 0,01$ ); el alto grado de correlación se obtuvo con dos, tres y hasta cuatro variables independientes. Para Cu y Zn se encontraron correlaciones consistentes tanto en la fase gástrica como intestinal, en cambio para Ni y Pb las correlaciones sólo fueron consistentes para la fase gástrica, en tanto para Cr sólo en la fase intestinal.

La mayoría de las correlaciones consideran el contenido de metal total así como algunas formas del metal en el suelo, tales como el metal intercambiable, el unido a la fracción reducible o unida a la fracción oxidable del suelo, fracciones que se obtienen con el procedimiento de extracción secuencial aplicado (BCR). Se observó una escasa o nula dependencia de variables relacionadas con propiedades fisicoquímicas del suelo, tales como pH, CIC o contenido de materia orgánica.

En varias correlaciones se observa un efecto positivo de la concentración de metal total sobre la concentración bioaccesible de los elementos, excepto para Cu bioaccesible en fase gástrica, lo que se podría explicar por la alta concentración en que se encuentra este metal en

el suelo, asociado al bajo pH en que se hace la extracción de la fase gástrica (pH 1,5), hechos que podrían producir una saturación del extractante glicina, limitando la extracción a mayor cantidad de metal total. Para los otros elementos, al estar en menor concentración en el suelo, no se produce este efecto, ya que glicina mantendría una capacidad suficiente para extraer a medida que aumenta la concentración total del metal. De forma similar se podría explicar la dependencia positiva que se observa en la concentración bioaccesible de varios metales, con respecto a metal unido a la fracción reducible u oxidable en el suelo, que al ser menor en el suelo no se manifestaría el efecto de saturación.

Tabla 8: Ecuaciones de regresión múltiple para estimar la concentración de metal bioaccesible en suelos mediante glicina.

Fase gástrica				
Metal	Ecuación <sup>a</sup>	n	R <sup>2</sup>	p
Cu	$B_{Cu} = 0,72 \times Msol. - 0,22 \times MTs. + 1,4 \times Mred. + 269$	18	0,99	<0,01
Ni	$B_{Ni} = 0,65 \times MTs. - 0,55 \times CIC - 1,4 \times Msol. + 2,2 \times Mox. - 2,9$	18	0,96	<0,01
Pb	$B_{Pb} = 0,39 \times CIC + 2,9 \times Mred. + 0,95 \times Mox. - 1,8$	18	0,99	<0,01
Zn	$B_{Zn} = 0,20 \times MTs. + 1,8 \times Msol. - 43$	18	0,99	<0,01
Fase intestinal				
Metal	Ecuación	n	R <sup>2</sup>	p
Cr	$B_{Cr} = 4,3 \times Mred. + 0,06 \times Mox. + 14$	18	0,97	<0,01
Cu	$B_{Cu} = 0,1 \times MTs. + 0,23 \times Msol. + 0,79 \times Mred. + 66$	18	0,99	<0,01
Zn	$B_{Zn} = 0,79 \times Msol. + 0,89 \times Mred. - 23$	18	0,99	<0,01

a: B, Metal bioaccesible; MTs, Contenido de metal total en suelo; CIC, Capacidad de Intercambio Catiónico; Msol., Contenido de metal soluble en suelo (BCR); Mred.: Contenido de metal unido a fracción reducible del suelo (BCR); Mox.: Contenido de metal unido a la fracción oxidable del suelo (BCR).

### 3.11.2. Regresión múltiple para la concentración bioaccesible de metales en plantas.

Los resultados de estas correlaciones se presentan en la tabla 9. Se relacionó la concentración bioaccesible de metal en la hoja de lechuga, con algunas variables que



involucran al metal en el tejido vegetal, como son la concentración de metal en la hoja, la raíz o en las fracciones subcelulares tales como pared celular, organelos y citoplasma celular. Se obtuvieron correlaciones consistentes para Zn en la fase gástrica e intestinal, en tanto que para Cu se observó una correlación múltiple en la fase gástrica y una correlación simple en la fase intestinal. El  $R^2$  estuvo en el rango 0,82 - 0,97 con un nivel de significancia del 5% o menos. En la mayoría de los casos las variables independientes tuvieron un efecto positivo sobre la bioaccesibilidad del metal.

La bioaccesibilidad de Cu y Zn en la fase gástrica fue dependiente del metal total en la raíz, debido probablemente al mayor contenido de ambos metales en esta parte de la planta, además en el caso de Zn, la bioaccesibilidad es dependiente del metal en la hoja, probablemente debido a que este elemento es traslocado en forma importante a la parte aérea de la planta. Si bien este efecto no se observa directamente para Cu, es probable que la dependencia de la variable fracción de metal unida a la pared celular (FSC.I), incluya también el efecto de la concentración de metal en la hoja.

La bioaccesibilidad de Cu y Zn en la fase intestinal fue dependiente de la concentración de metal en la hoja de la planta, siendo la única variable que influyó en el caso de Cu. Sin embargo, el caso de Zn la bioaccesibilidad fue dependiente también de la fracción de metal unido a la pared celular y de la fracción soluble en el citoplasma.

Tabla 9: Ecuaciones de regresión múltiple y regresión simple para estimar la concentración de metal bioaccesible en plantas de lechuga mediante glicina

Fase gástrica				
Metal	Ecuación <sup>a</sup>	n	R <sup>2</sup>	p
Cu	$B_{Cu} = 0,01 \times MTr. + 0,67 \times FSC.I + 3,6$	18	0,82	<0,01
Zn	$B_{Zn} = 0,66 \times MTh. + 0,07 \times MTr. + 1,8$	18	0,97	<0,01
Fase intestinal				
Metal	Ecuación	n	R <sup>2</sup>	p
Cu	$B_{Cu} = 0,27 \times MTh. + 3,3$	18	0,80 <sup>b</sup>	<0,01
Zn	$B_{Zn} = 0,35 \times MTh. + 0,78 \times FSC.III - 0,86 \times FSC.I + 7,6$	18	0,95	<0,01

a: B, Metal bioaccesible; MTh, Contenido de metal total en hoja; MTr, Metal total en raíz; FSC.I, Fracción de metal localizado en la pared celular; FSC.III, Fracción de metal soluble en el citoplasma;  
b: Coeficiente de correlación (r).

#### 4. CONCLUSIONES

1. Los suelos de este estudio presentan distinto grado de contaminación por metales. El suelo Cauquenes presenta contaminación media por Cu y ligera por Mn. Por su parte, el suelo Rancagua presenta contaminación media por Cu y ligera por Mn y Cd. Mientras que el suelo Mapocho presenta contaminación media por Mn y ligera por Cd y Cr.
2. Los métodos implementados para determinar el metal bioaccesible, basados en la extracción por un tampón de glicina y otro que utiliza una extracción por compuestos presentes en el tracto gastrointestinal humano, fueron útiles para determinar la bioaccesibilidad de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos y plantas
3. La fuerza extractiva y las condiciones de aplicación de ambos fluidos, así como la concentración total de metal en la matriz fueron determinantes en el resultado; de esta forma, Cd, Cu y Zn fueron extraídos en la fase gástrica e intestinal, con ambos fluidos, tanto en los suelos como en la planta, en cambio Cr, Ni y Pb fueron extraídos sólo en los suelos, en una de las fases y sólo con glicina.
4. Los metales presentes en el suelo fueron más bioaccesibles en la fase gástrica que en la fase intestinal, excepto en el caso de cromo. En general, el orden en que los metales fueron bioaccesibles fue  $Cd > Pb > Zn > Cu \gg Ni > Cr$ . La fortificación del suelo Mapocho con Cd, Pb y Zn, puso en evidencia que Cd es bioaccesible en la fase gástrica y en la fase intestinal, y que Pb es bioaccesible solo en la fase gástrica, reafirmando además que Zn es bioaccesible en ambas fases.
5. Para la mayoría de los metales, la forma química predominante en los suelos es la fracción residual. Los elementos Cd, Cu, Ni y Zn se distribuyen en las formas intercambiable, reducible, oxidable y residual en la mayoría de los suelos, en tanto que Cr y Pb se encuentran principalmente en las fracciones oxidable y residual. En el suelo fortificado, la incorporación

de Cd y Zn aumenta notoriamente el contenido en la fracción intercambiable y reducible, en tanto que Pb incrementa su fracción reducible y oxidable en el suelo.

6. Los elementos Cr, Cu, Ni y Zn fueron más biodisponibles en la raíz que en la parte aérea, en los tres suelos, en tanto que Cd fue más biodisponible en la parte aérea y sólo en el suelo fortificado. El Pb no fue detectado en la planta.
7. Se implementó un método para determinar el metal asociado a tres fracciones subcelulares en el tejido vegetal. Éstas fueron el metal presente en la pared celular, metal presente en los organelos y metal asociado a componentes del citoplasma. Los elementos Cd, Cu y Zn se presentan en las tres fracciones, predominando las fracciones de metal unido a pared celular y citoplasma. El Cu y Zn fue detectado en las plantas cultivadas en los tres suelos, en tanto que Cd sólo en plantas cultivadas en suelo fortificado con metal.
8. Los resultados de bioaccesibilidad en suelos y plantas respondieron consistentemente a un análisis de correlaciones múltiples. En suelos, las variables más importantes fueron el contenido de metal total y unido en distintas formas en el suelo, siendo escasa la dependencia con variables relacionadas a propiedades fisicoquímicas del suelo. En las plantas, las variables más significativas fueron el contenido de metal en la parte aérea y raíz, así como la fracción de metal unido a la pared celular y soluble en el citoplasma.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E.,** Carrasco, M.A., León, O., Martínez, E., Silva, P., Castillo, G., Ahumada, I., Borie, G., González, S. **2005.** Metales pesados en el suelo. *En: Criterios de Calidad de Suelos y Aguas de Riego.* Chile, Servicio Agrícola y Ganadero. pp. 66-98.
- Anxiang, L.,** Shuzhen, Z., Xiangyang, Q., Wenyong, W., Honglu, L. **2009.** Aging effect on the mobility and bioavailability of Cooper in Soil. *Journal of Environmental Sciences* 21: 173-178.
- Belmonte, F.,** Romero, A., Alonso, F., Moreno, J., Rojo, S. **2010.** Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del sureste de España. *Papeles de Geografía* 51-52: 45-54.
- Black, A.,** McLaren, R., Reichman, S., Speir, T., Condrón, L. **2011.** Evaluation of soil metal bioavailability estimates using two plant species (*L. perenne* and *T. aestivum*) grown in a range of agricultural soils treated with biosolids and metal salts. *Environmental Pollution* 159: 1523-1535.
- Cheng, S.** **2003.** Heavy Metal Pollution in China: Origin, Pattern and Control. *Environmental Science & Pollution Research* 10 (3): 192-198.
- Chojnacka, K.,** Chojnacki, A., Górecka, H., Górecki, H. **2005.** Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Science of The Total Environment* 337 (1-3): 175-182.
- Elzinga, E.,** Cirimo, A. **2010.** Application of sequential extractions and X-ray absorption spectroscopy to determine the speciation of chromium in Northern New Jersey marsh soils developed in chromite ore processing residue (COPR). *Journal of Hazardous Materials* 183: 145–154.
- Feng, M.,** Shan, X., Zhang, S., Wen, B. **2005a.** A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, and NaNO<sub>3</sub> extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137: 231-240.
- Feng, M.,** Shan, X., Zhang, S., Wen, B. **2005b.** Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59: 939–949.
- Galán, E.,** Romero, A. **2008.** Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla* 10: 48-60.
- Garrido, T.,** Mendoza, J. **2008.** Efecto de los biosólidos sobre la movilidad de cobre en suelos contaminados. Tesis para optar al título de Doctora en Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 150p.
- Gomes, P.,** Fontes, M., Da Costa, L., Mendoca, E. **1997.** Extração fracionada de metais pesados em latossolo vermelho-amarelo. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 21: 453-551.
- González, E.,** Tornero, M., Ángeles, Y., Bonilla, N., **2009.** Concentración total y especiación de metales pesados en biosólidos de origen urbano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25(1): 15-22.

- Hong-Yun, P.,** Xiao-E, Y., Sheng-Ke, T. **2005.** Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science* 6B(5): 311-318.
- Hosseinpur, A.,** Zarenia, M. **2012.** Evaluating chemical extractants to estimate available potassium for pinto beans (*Phaseolus vulgaris*) in some calcareous soils. *Plant, Soil and Environment* 58: 42–48.
- Houba, V.,** Lexmond, T., Novozamsky, I., Van der Lee, J. **1996.** State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of the Total Environment* 178(1-3): 21–28.
- Intawongse, M.,** Dean, J. **2008.** Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution* 152: 60-72.
- ISO/DIS 17402, 2006.** Soil quality: Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil Materials. Genova, International Organization for Standardization. 37p.
- Jarvis, S.,** Jones, L., Hopper, M. **1976.** Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. *Plant and Soil* 44: 179-191.
- Kucak, A.,** Blanusa, M. **1998.** Comparison of extraction procedures for determination of trace metals in soil by atomic absorption spectrometry. *Arh hig rada toksikol* 49: 327-334.
- Laird, B.,** Peak, D., Siciliano, S. **2011.** Bioaccessibility of Metal Cations in Soil Is Linearly Related to Its Water Exchange Rate Constant. *Environmental Science & Technology* 45: 4139-4144.
- Lamb, D.,** Ming, H., Megharaj, M., Naidu, R. **2009.** Heavy metal (Cu, Zn, Cd and Pb) partitioning and bioaccessibility in uncontaminated and long-term contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 171: 1150-1158.
- Li, S.,** Lin, L., Zheng, F., Wang, Q. **2011.** Metal bioavailability and risk assessment from edible brown alga *Laminaria japonica*, using biomimetic digestion and absorption system and determination by ICP-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 822–828.
- Liu, J.,** Duan, C., Zhang, X., Zhu, Y., Hu, C. **2009.** Subcellular distribution of chromium in accumulating plant *Leersia hexandra* Swartz. *Plant Soil* 322: 187-195.
- Ljung, K.,** Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., Berglund, M. **2007.** Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42: 1241–1250.
- Luzio, W.,** Seguel, O., Casanova, M., **2010.** Suelos de la zona mediterránea árida. *En: Suelos de Chile*. Universidad de Chile, Santiago. pp. 125–194.
- Marques, A.,** Lourenco, H., Nunes, M., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., Rainieri, S., Langerholc, T., Cencic, A. **2011.** New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International* 44: 510-522.

- Mehmood, F.,** Rashid, A., Mahmood, T., Dawson, L. **2013.** Effect of DTPA on Cd solubility in soil – Accumulation and subsequent toxicity to lettuce. *Chemosphere* 90: 1805-1810.
- Mendoza, J.,** Garrido, T., Castillo, G., San Martin, N. **2006.** Metal availability and uptake by sorghum plants grown in soils amended with sludge from different treatments. *Chemosphere* 65: 2304–2312.
- Meunier, L.,** Walker, S., Wragg, J., Parsons, M., Koch, I., Jamieson, H., Reimer, K. **2010.** Effects of Soil Composition and Mineralogy on the Bioaccessibility of Arsenic from Tailings and Soil in Gold Mine Districts of Nova Scotia. *Environmental Science & Technology* 44: 2667–2674.
- Ministerio De Medio Ambiente. 2012.** Contaminación de suelos. En: Informe del Estado del Medio Ambiente. 2<sup>a</sup> ed. Chile, AMF S.A.. pp. 114-135.
- Mossop, K.,** Davidson, C. **2003.** Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Analytica Chimica Acta* 478: 111–118.
- Oomen, A.,** Rompelberg, C., Bruil, M., Dobbe, C., Pereboom, D., Sips, A. **2003.** Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 281–287.
- Ovca, A.,** Van Elteren, J., Falnoga, I., Selih, V. **2012.** Comparison of zinc species in two specimens of edible plants and their fate in the human gastrointestinal tract. *Pure and Applied Chemistry* 84: 301-311.
- Papassiopi, N.,** Kontoyianni, A., Vaxevanidou, K., Xenidis, A. **2009.** Assessment of chromium biostabilization in contaminated soils using standard leaching and sequential extraction techniques. *Science of the total environment* 407: 925-936.
- Peijnenburg, W.,** Jager, T. **2003.** Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 63–77.
- Poggio, L.,** Vrscaj B., Schulin R., Hepperle E., Marsan, F. **2009.** Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). *Environmental Pollution* 157: 680–689.
- Reeder, R.,** Schoonen, M., Lanzirotti, A. **2006.** Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 64: 59-113.
- Sadzawka, A.,** Grez, R., Mora, M., Saavedra, N., Carrasco, M., Rojas, C. **2000.** Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA), Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, Chile.
- SAG, 2005.** Criterios de calidad de suelo agrícola. Participantes E. Acevedo, M. Carrasco, O. León, E. Martínez, P. Silva, G. Castillo, I. Ahumada, G. Borie y S. González. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Chile. Sitio web: [http://www2.sag.gob.cl/Recursos-Naturales/criterios\\_calidad\\_suelos\\_agricolas/](http://www2.sag.gob.cl/Recursos-Naturales/criterios_calidad_suelos_agricolas/).

- Saikat, S., Barnes, B., Westwood, D. 2007.** A review of laboratory results for bioaccessibility values of arsenic, lead and nickel in contaminated UK soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42: 1213–1221.
- Schalscha, E., Ahumada, I. 1998.** Heavy metals in rivers and soils of central Chile. *Water Science and Technology* 37 (8): 251-255.
- Semple, T., Doick, K., Jones, K., Buranel, P., Craven, A., Harms, H. 2004.** Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* 38: 228A-231A.
- Sialelli, J., Davidson, C., Hursthouse, A., Ajmone-Marsan, F. 2011.** Human bioaccessibility of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in urban soils from the city of Torino, Italy. *Environmental Chemistry Letters* 9:197–202.
- Sposito, G., Lund, L., Chang, A. 1989.** Trace Metal Chemistry in Arid Zone Field Soil amended with Sewage Sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in Solid Phases. *Soil Science Society of America Journal* 46: 260-264.
- Sposito, G. 2008.** *The Chemistry of Soils*. 2<sup>a</sup> ed. Nueva York, Oxford University Press Inc. 344p.
- Sun, L., Liu, G., Yang, M., Zhuang, Y. 2012.** Bioaccessibility of cadmium in fresh and cooked *Agaricus blazei* Murill assessed by in vitro biomimetic digestion system. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1729-1733.
- Tessier, A., Campbell, P.G., Bisson, N. 1979.** Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry* 51: 844-851.
- Turner, A. 2011.** Oral bioaccessibility of trace metals in household dust: a review. *Environmental Geochemistry and Health* 33: 331-341.
- Van De Wiele, T., Oomen, A., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rompelberg, C., De Zwart, L., Klinck, B., Van Wijnen, J., Verstraete, W., Sips, A. 2007.** Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42: 1203–1211.
- Vilar, S., Gutiérrez, A., Antezana, J., Carral, P., Álvarez, A. 2003.** Estudio comparativo de diferentes métodos de extracción secuencial para metales pesados en suelos. *Boletín Geológico y Minero* 114: 453-461.
- Wallace, W., Lee, B., Luoma, S. 2003.** Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249: 183–197.
- Weigel, H., Jager, H. 1980.** Subcellular Distribution and Chemical Form of Cadmium in Bean Plants. *Plant Physiology* 65: 480-482.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., Imborvungu, J.A. 2010.** Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. *International Journal of Environmental Science and Technology* 7: 485-496.
- Yaron, B., Calvet, R., Prost, R. 1996.** *Soil Pollution, Processes and Dynamics*. Berlin, Springer. 313p.



- Young, S.,** Zhang, H., Tye, A., Maxted, A., Thums, C., Thornton, I. **2006.** Characterizing the availability of metals in contaminated soils. I. The solid phase: sequential extraction and isotopic dilution. *Soil Use and Management* 21: 450–458
- Zhang, H.,** Zhao, F., Sun, B, Davidson, W., Mcgrath, S. **2001.** A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science & Technology* 35: 2602-2607.

## 6. ANEXOS

Tabla 1: Directivas de Kelley para la clasificación de suelos contaminados.

Parámetro	Suelos no contaminados	Contaminación (mg/kg suelo seco)			
		Ligera	Media	Alta	Muy alta
<b>pH ácido</b>	6 - 7	5 - 6	4 - 5	2 - 4	< 2
<b>pH alcalino</b>	7 - 8	8 - 9	9 - 10	10 - 12	12 <
<b>Arsénico</b>	0 - 30	30 - 50	50 - 100	100 - 500	> 500
<b>Cadmio</b>	0 - 1	1 - 3	3 - 10	10 - 50	> 50
<b>Cromo</b>	0 - 100	100 - 200	200 - 500	500 - 2500	> 2500
<b>Cobre (disponible)</b>	0 - 100	100 - 200	200 - 500	500 - 2500	> 2500
<b>Plomo</b>	0 - 500	500 - 1000	1000 - 2000	2000 - 1%	> 1%
<b>Plomo (disponible)</b>	0 - 200	200 - 500	500 - 1000	1000 - 5000	> 5000
<b>Manganeso</b>	0 - 500	500 - 1000	1000 - 2000	2000 - 1%	> 1%
<b>Níquel (disponible)</b>	0 - 20	20 - 50	50 - 200	200 - 1000	> 1000
<b>Cinc (disponible)</b>	0 - 250	250 - 500	500 - 1000	1000 - 5000	> 5000

Tabla 2: Concentración de formas químicas obtenidas para Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (mg/kg) mediante extracción secuencial de los suelos Cauquenes, Rancagua, Mapocho y suelos fortificados.

	Fracción I	Fracción II	Fracción III	Fracción IV
<b>Cauquenes</b>				
Cd	0,56 ± 0,10	0,40 ± 0,01	0,66 ± 0,09	1,3 ± 0,2
Cr	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	28 ± <1
Cu	608 ± 20	678 ± 19	426 ± 8	345 ± 43
Ni	0,96 ± 0,01	1,4 ± 0,5	3,5 ± 0,1	22 ± <1
Pb	n.d.	3,2 ± 0,7	2,9 ± 0,4	22 ± <1
Zn	19 ± 1	26 ± 3	16 ± 1	114 ± 2
<b>Rancagua</b>				
Cd	n.d.	n.d.	0,85 ± 0,06	1,8 ± 0,1
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	26 ± <1
Cu	181 ± 8	376 ± 6	392 ± 7	359 ± 5
Ni	n.d.	n.d.	3,9 ± <0,1	27 ± <1
Pb	n.d.	n.d.	5,7 ± 0,2	27 ± <1
Zn	12 ± 1	26 ± <1	23 ± 1	125 ± 3
<b>Mapocho</b>				
Cd	0,45 ± 0,06	0,71 ± 0,01	1,1 ± <0,1	1,6 ± 0,1
Cr	n.d.	1,6 ± <0,1	89 ± 5	44 ± 5
Cu	7,5 ± 0,3	24 ± 1	150 ± 9	458 ± 9
Ni	2,0 ± 0,4	6,5 ± 0,2	7,4 ± 0,1	29 ± <1
Pb	n.d.	n.d.	13 ± 1	37 ± 1
Zn	23 ± 1	65 ± 3	63 ± 2	185 ± 5
<b>Mapocho + Cd</b>				
Cd	4,5 ± <0,1	8,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1
<b>Mapocho + Pb</b>				
Pb	n.d.	13 ± 1	66 ± 3	67 ± 3
<b>Mapocho + Zn</b>				
Zn	322 ± 4	325 ± 11	118 ± 12	331 ± 2

a: n.d., No detectado.

Tabla 3: Concentración de especies químicas obtenidas para Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (%) mediante extracción secuencial de los suelos Cauquenes, Rancagua, Mapocho y suelos fortificados.

	Fración I	Fración II	Fración III	Fración IV
<b>Cauquenes</b>				
Cd	19 ± 3	14 ± <1	23 ± 3	45 ± 7
Cr	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	100 ± <1
Cu	30 ± 1	33 ± 1	21 ± <1	17 ± 2
Ni	3,4 ± <0,1	5,1 ± 1,6	12 ± <1	79 ± <1
Pb	n.d.	11 ± 3	10 ± 1	79 ± <1
Zn	11 ± <1	15 ± 2	9,1 ± 0,7	65 ± 1
<b>Rancagua</b>				
Cd	n.d.	n.d.	32 ± 2	68 ± 4
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	100 ± <1
Cu	14 ± 0,61	29 ± <1	30 ± 1	27 ± <1
Ni	n.d.	n.d.	13 ± <1	87 ± <1
Pb	n.d.	n.d.	17 ± 1	83 ± <1
Zn	6,5 ± 0,54	14 ± <1	12 ± 1	67 ± 2
<b>Mapocho</b>				
Cd	12 ± 2	19 ± <1	28 ± 1	42 ± 3
Cr	n.d.	1,2 ± <0,1	66 ± 4	33 ± 4
Cu	1,2 ± <0,1	3,8 ± 0,1	23 ± 1	72 ± 1
Ni	4,5 ± 1,0	15 ± <1	16 ± <1	65 ± <1
Pb	n.d.	n.d.	27 ± 1	73 ± 2
Zn	6,8 ± 0,2	19 ± 1	19 ± 1	55 ± 1
<b>Mapocho + Cd</b>				
Cd	28 ± <1	52 ± <1	11 ± <1	8,7 ± 0,6
<b>Mapocho + Pb</b>				
Pb	n.d.	8,9 ± 0,7	45 ± 2	46 ± 2
<b>Mapocho + Zn</b>				
Zn	29 ± <1	30 ± 1	11 ± 1	30 ± <1

a: n.d., No detectado.

Tabla 4: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos, mediante glicina.

	Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
<b>Fase gástrica</b>						
Cd	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	15 ± 1	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	18 ± 1	16 ± 3	17 ± <1	18 ± <1
Cu	1176 ± 44	624 ± 8	165 ± 1	170 ± 2	171 ± 2	171 ± 4
Ni	14 ± 1	15 ± 1	20 ± 1	23 ± 1	24 ± <1	26 ± 1
Pb	15 ± <1	11 ± <1	27 ± 1	27 ± <1	112 ± 4	21 ± <1
Zn	23 ± 1	18 ± <1	71 ± 5	74 ± 1	73 ± 2	768 ± 10
<b>Fase intestinal</b>						
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	8,0 ± 0,6	n.d.	n.d.
Cr	14 ± <1	14 ± 1	25 ± 2	26 ± 1	24 ± 1	24 ± 1
Cu	956 ± 11	541 ± 7	149 ± 1	155 ± 3	153 ± 3	155 ± 3
Ni	n.d.	n.d.	8,4 ± 0,2	8,0 ± 0,4	8,2 ± 0,1	8,5 ± 0,1
Pb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	13 ± 1	11 ± 2	50 ± <1	55 ± 1	58 ± 5	520 ± 11

a: n.d., No detectado.

Tabla 5: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos, mediante sustituto de fluido gastrointestinal.

	Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
<b>Fase gástrica</b>						
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	13 ± 2	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	15 ± 1	15 ± 1	13 ± 1	14 ± 1
Cu	1218 ± 128	614 ± 21	164 ± 3	161 ± 3	248 ± 29	266 ± 39
Ni	n.d.	n.d.	11 ± 1	12 ± 3	14 ± 1	12 ± 1
Pb	n.d.	n.d.	11 ± 1	12 ± 3	14 ± 1	12 ± 1
Zn	22 ± 6	20 ± 2	89 ± 11	78 ± 3	86 ± 2	749 ± 34
<b>Fase intestinal</b>						
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	3,8 ± 0,1	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	9,9 ± 0,8	9,7 ± 0,2	9,7 ± 0,6	10 ± 1
Cu	549 ± 18	320 ± 31	94 ± 1	94 ± 0	148 ± 6	153 ± 4
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	41 ± 2	4,0 ± 0,4	9,3 ± 0,2	8,6 ± 1,2	8,2 ± 0,4	105 ± 5

a: n.d., No detectado.

Tabla 6: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn bioaccesible (mg/kg) en suelos cultivados y no cultivados, mediante glicina.

		Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
Fase gástrica							
Cd	C	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	13 ± 1	n.d.	n.d.
	NC	n.d.	n.d.	n.d.	12 ± 0	n.d.	n.d.
Cr	C	n.d.	n.d.	15 ± 0	16 ± 0	17 ± 0	17 ± 0
	NC	n.d.	n.d.	17 ± 1	17 ± 0	17 ± 0	18 ± 0
Cu	C	1208 ± 31	625 ± 6	161 ± 2	172 ± 17	160 ± 1	161 ± 3
	NC	1130 ± 20	609 ± 16	159 ± 2	156 ± 1	158 ± 4	159 ± 2
Ni	C	7,1 ± 1,7	6,1 ± 0,0	7,7 ± 0,3	10 ± 1	10 ± 1	9,4 ± 2,5
	NC	8,2 ± 1,3	9,0 ± 0,9	10 ± 1	14 ± 1	12 ± 0	14 ± 0
Pb	C	n.d.	n.d.	21 ± 3	17 ± 4	92 ± 2	18 ± 2,53
	NC	n.d.	n.d.	20 ± 4	17 ± 1	94 ± 4	19 ± 0,58
Zn	C	36 ± 10	18 ± 1	78 ± 7	75 ± 4	73 ± 3	694 ± 22
	NC	25 ± 1	21 ± 4	71 ± 1	70 ± 0	74 ± 3	677 ± 35
Fase intestinal							
Cd	C	n.d.	n.d.	n.d.	6,2 ± 0,1	n.d.	n.d.
	NC	n.d.	n.d.	n.d.	5,4 ± 0,3	n.d.	n.d.
Cr	C	n.d.	n.d.	12 ± 0	12 ± 1	13 ± 0	12 ± 1
	NC	n.d.	n.d.	11 ± 1	11 ± 0	12 ± 0	11 ± 1
Cu	C	950 ± 2	517 ± 15	132 ± 8	149 ± 17	138 ± 6	136 ± 2
	NC	893 ± 4	488 ± 11	134 ± 7	127 ± 1	128 ± 1	128 ± 0
Ni	C	14 ± 0	8,6 ± 0,8	16 ± 1	16 ± 0	16 ± 0	17 ± 1
	NC	14 ± 1	12 ± 1	18 ± 1	17 ± 4	19 ± 0	20 ± 0
Pb	C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	C	11 ± 0	7,8 ± 0,5	22 ± 1	24 ± 3	25 ± 8	288 ± 39
	NC	12 ± 1	9,1 ± 0,4	19 ± 4	24 ± 0	22 ± 0	330 ± 9

a: n.d., No detectado; C: Suelo cultivado; NC: Suelo no cultivado

Tabla 7: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn biodisponible (mg/kg) en suelos, mediante cultivos de lechuga.

Tratamiento	Parte	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Cauquenes	Aérea	n.d. <sup>a</sup>	3,1 ± 0,5	16 ± 5	n.d.	n.d.	21 ± 10
	Raíz	n.d.	13 ± 4	398 ± 137	8,5 ± 1,9	n.d.	40 ± 17
Rancagua	Aérea	n.d.	3,5 ± 1,0	11 ± 1	5,1 ± 0,8	n.d.	36 ± 2
	Raíz	n.d.	7,6 ± 1,6	352 ± 5	13 ± 1	n.d.	44 ± 2
Mapocho	Aérea	n.d.	3,6 ± 1,1	9,6 ± 0,8	7,9 ± 1,0	n.d.	47 ± 5
	Raíz	n.d.	17 ± 2	96 ± 21	17 ± 1	n.d.	66 ± 4
Mapocho + Cd	Aérea	16 ± 1	3,7 ± 0,1	9,0 ± 1,0	9,1 ± 0,4	n.d.	43 ± 5
	Raíz	12 ± 2	31 ± 8	91 ± 25	23 ± 1	n.d.	51 ± 32
Mapocho + Pb	Aérea	n.d.	3,5 ± 0,4	9,0 ± 1,3	10 ± 1	n.d.	47 ± 1
	Raíz	n.d.	17 ± 1	89 ± 3	21 ± 2	n.d.	69 ± 11
Mapocho + Zn	Aérea	n.d.	5,2 ± 1,5	12 ± 0	12 ± 1	n.d.	121 ± 7
	Raíz	n.d.	26 ± 8	93 ± 37	25 ± 2	n.d.	373 ± 65

a: n.d., No detectado

Tabla 8: Concentración de Cd, Cu y Zn (mg/kg) alojados en la pared celular, organelos y citoplasma de células vegetales de hojas de lechuga.

		Fracción I	Fracción II	Fracción III	Sumatoria	Metal total hoja
Cauquenes	Cd	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	---	n.d.
	Cu	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,2	2,8 ± 0,4	8,3 ± 0,9	16 ± 5
	Zn	9,0 ± 1,1	8,1 ± 1,0	9,0 ± 2,1	36 ± 17	21 ± 10
Rancagua	Cd	n.d.	n.d.	n.d.	---	n.d.
	Cu	2,1 ± 0,2	0,4 ± 0,0	3,4 ± 0,3	6,1 ± 0,3	11 ± 1
	Zn	7,6 ± 1,0	7,3 ± 0,6	9,4 ± 1,4	27 ± 6	36 ± 2
Mapocho*	Cd	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Cu	3,8 ± 0,3	1,0 ± 0,6	4,3 ± 2,0	9,1 ± 1,4	9,6 ± 0,8
	Zn	17 ± 2	11 ± 2	13 ± 1	43 ± 5	47 ± 5
Mapocho + Cd	Cd	8,0 ± 0,3	3,6 ± 0,4	4,3 ± 0,4	16 ± 1	16 ± 1
	Cu	3,5 ± 0,9	1,4 ± 0,0	3,0 ± 0,5	8,1 ± 2,0	9,0 ± 1,0
	Zn	17 ± 2	11 ± 2	13 ± 1	43 ± 5	47 ± 5
Mapocho + Zn	Cd	n.d.	n.d.	n.d.	---	n.d.
	Cu	4,0 ± 0,5	0,53 ± 0,02	5,7 ± 0,3	10 ± 1	12 ± <1
	Zn	21 ± 3	19 ± 3	52 ± 7	97 ± 10	121 ± 7

a: n.d., No detectado.; Fracción I: Metal unido a la pared celular; Fracción II: Metal unido a organelos; Fracción III: Metal soluble en citoplasma.

Tabla 9: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn bioaccesible (mg/kg) en hojas de lechuga, mediante glicina.

	Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
<b>Fase gástrica</b>						
Cd	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	16 ± 1	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cu	11 ± 2	8,7 ± 1,1	6,9 ± 0,5	6,7 ± 0,5	6,9 ± 0,5	7,6 ± 1,0
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	11 ± 1	27 ± 10	40 ± 3	36 ± 2	39 ± 3	109 ± 6
<b>Fase intestinal</b>						
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	8,2 ± 0,7	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cu	8,6 ± 1,6	7,0 ± 1,0	6,0 ± 0,6	5,0 ± 0,4	5,5 ± 0,2	6,9 ± 0,7
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	11 ± 1	24 ± 8	19 ± 1	18 ± <1	19 ± 1	75 ± 5

a: n.d., No detectado.

Tabla 10: Concentración de Cd, Cr, Cu, Ni y Zn bioaccesible (mg/kg) en hojas de lechuga, mediante sustituto de fluido gastrointestinal

	Cauquenes	Rancagua	Mapocho	Mapocho + Cd	Mapocho + Pb	Mapocho + Zn
<b>Fase gástrica</b>						
Cd	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	18 ± 1	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cu	8,6 ± 2,1	6,6 ± 1,5	8,2 ± 3,0	9,1 ± 0,4	9,1 ± 0,3	10 ± 1
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	39 ± 14	44 ± 11	33 ± 6	31 ± 1	37 ± 2	111 ± 8
<b>Fase intestinal</b>						
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	5,9 ± 0,4	n.d.	n.d.
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cu	8,0 ± 0,9	6,5 ± 0,9	7,2 ± 2,2	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,4	6,9 ± 0,6
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	26 ± 1	25 ± 6	30 ± 4	25 ± 5	28 ± 4	54 ± 4

a: n.d., No detectado.