



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

**EFFECTO DE LA MATERIA ORGANICA SOLUBLE Y COLOIDAL  
DE LOS BIOSÓLIDOS SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE Cu,  
Pb, Ni, Cd Y LOS NIVELES DE ACIDO ASCORBICO Y  
GLUTATION EN PLANTAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

**RAUL RIVEROS SALVATIERRA**

PROFESOR PATROCINANTE:

Jorge Mendoza Crisosto

DIRECTORES DE TESIS:

Jorge Mendoza Crisosto

José Parada Aliste

SANTIAGO, CHILE

**2007**

## INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Sistema GSH/GSSG y AA/ADHA en plantas y su respuesta al estrés por diversos factores ambientales	5
1.2 Efecto de metales sobre niveles de glutatión y AA	7
1.3 Análisis de GSH/GSSG y AA/ADHA en matrices vegetales	8
1.4 Electroforesis capilar	9
1.5 Materia orgánica soluble (MOS)	12
1.6 Absorción y translocación de metales en las plantas	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo General	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Soluciones y estándares	17
3.1.1 Electrolitos de corrida para electroforesis capilar	17
3.1.2 Estándares de los analitos	17
3.1.3 Agentes para la reducción de ADHA a AA	17
3.1.4 Preparación de estándares de calcio, magnesio, fósforo, potasio y metales	18
3.2 Curvas de Calibración y Límites de Detección	18
3.3 Sistema de electroforesis capilar	20
3.4 Optimización de los parámetros instrumentales y de preparación de la muestra	20
3.5 Obtención de la MOS y MOC	21
3.6 Cultivo de plantas y tratamiento con materia orgánica y metal	21
3.7 Análisis de GSH/GSSG y AA/ADHA	22

	Página	
3.8	Análisis de metales en las plantas	23
3.9	Análisis estadístico	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	Optimización de las condiciones instrumentales para el análisis de AA/ADHA	24
4.2	Reducción de ADHA a AA	27
4.3	Optimización del método para la determinación de GSH y GSSG	31
4.4	Protocolo de tratamiento de las muestras para su análisis	35
4.5	Rendimiento del material vegetal	36
4.6	Absorción de metales y macronutrientes	38
4.6.1	Cobre	38
4.6.2	Plomo	40
4.6.3	Cadmio	41
4.6.4	Níquel	41
4.6.5	Macronutrientes	43
4.7	Efecto de MOS y MOC sobre niveles de metal y nutrientes en la planta	46
4.8	Efecto de los metales sobre niveles de GSH/GSSG y AA/ADHA	47
4.9	Efecto de MOS sobre niveles de GSH/GSSG y AA/ADHA	51
5.	CONCLUSIONES	52
6.	REFERENCIAS	54
7.	ANEXOS	58

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la materia orgánica soluble y la materia orgánica coloidal de dos biosólidos obtenidos por distintos procesos, sobre la biodisponibilidad de cobre, plomo, cadmio, níquel y niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH), ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

El estudio involucró el cultivo hidropónico de plantas bajo condiciones controladas y el análisis de elementos mediante espectroscopía de absorción atómica, emisión atómica y espectroscopía molecular. El análisis de las formas de glutatión, ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico se llevó a cabo por electroforesis capilar de zona (ECZ), para lo cual se optimizaron las condiciones de análisis y pretratamiento de las muestras de tejido vegetal.

Las conclusiones de este estudio fueron:

La electroforesis capilar es una técnica apropiada para el estudio de las formas oxidada y reducida de ácido ascórbico. Fue posible establecer un método para la cuantificación de ácido ascórbico y por diferencia el ácido dehidroascórbico, bajo condiciones de electromigración en zonas, detección directa por absorción UV, modo de polaridad normal y electrolito de alta fuerza iónica.

La Tris [2-carboxietil] fosfina (TCEP) fue efectivo como reductor del ácido dehidroascórbico en la matriz ácida constituida por MPA 2%. La aplicación de una concentración de 1 mM por 24 horas a temperatura ambiente reduce el ADHA produciendo cantidades cuantificables de ácido ascórbico. El efecto reductor es independiente de la presencia de AA en la muestra.

La materia orgánica soluble modifica la biodisponibilidad de los metales pesados en solución, efecto que depende de cada elemento y se manifiesta en un cambio en la concentración de los elementos en la parte aérea y raíz de la planta. A nivel foliar la MOS disminuye la concentración de cobre y cadmio, incrementa la de plomo y no presenta efecto sobre níquel. A nivel de la raíz, el comportamiento es distinto, cobre, plomo y níquel disminuyen su concentración respecto de un tratamiento solo con metal y cadmio la incrementa.

La asociación de materia orgánica soluble con materia orgánica coloidal presenta un efecto sinérgico sobre la translocación del metal a la parte aérea de la planta. Este efecto se manifestó para cobre y cadmio en una mayor disminución de su concentración foliar en comparación a la sola aplicación de MOS. Este efecto no fue observado en la raíz.

El efecto de cobre cadmio y plomo sobre los sistemas de glutatión reducido/glutatión oxidado y ácido ascórbico/dehidroascórbico en la planta difieren para cada elemento y tipo de tejido. Para los péptidos el efecto se produce principalmente en la raíz. El cobre disminuye los niveles de ambos péptidos, en cambio plomo y cadmio tienen efecto solo sobre glutatión oxidado con disminución e incremento, respectivamente. Para el sistema ácido ascórbico/dehidroascórbico, los tres elementos disminuyen levemente el nivel de ácido ascórbico foliar, en tanto que en la raíz se observó efecto solo para cobre con disminución. Los experimentos de este estudio no evidenciaron la presencia de ácido dehidroascórbico en la planta.

La asociación de materia orgánica soluble y metal en comparación al tratamiento solo con metal produce cambios en los niveles de glutatión reducido, glutatión oxidado y ácido ascórbico. Los mayores cambios se observaron para cadmio el cual incrementó los niveles de glutatión oxidado en parte aérea y raíz, en tanto que disminuyó los niveles de glutatión y ácido ascórbico en la raíz. Por su parte, la asociación plomo incrementó los niveles de ambos péptidos en la raíz.

## SUMMARY

**“Effect of soluble and colloidal organic matter from biosolids on bioavailability of Cu, Pb, Ni, Cd and levels of ascorbic acid and glutathione in plants”.**

The purpose of this study was assess the effect of soluble organic matter (SOM) and colloidal organic matter (COM) from two sewage sludge obtained by different processes, on the bioavailability of copper, lead, cadmium and nickel besides of oxidized and reduced forms of glutathione, ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHAA) levels in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.).

This study involved the hydroponics cultivation of plants under controlled conditions and their elements analysis through atomic absorption spectrophotometry, atomic emission and molecular spectrophotometry. The analysis of glutathione forms, ascorbic acid and dehydroascorbic acid was carried out by Capillary Zone Electrophoresis (CZE), for which was optimized the analysis and pretreatment conditions of vegetal tissue samples.

The conclusions of this study were:

The Capillary Electrophoresis is a suitable technique for study the oxidized and reduced forms of ascorbic acid. It was possible to establish a method to quantify ascorbic acid and by subtraction the dehydroascorbic acid, under conditions of electromigration in zones, direct detection by UV absorption, normal polarity set and a high ionic strength of electrolyte.

The Tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) was an effective reductor of dehydroascorbic acid in the acid matrix containing MPA 2%. The applications of a concentration of 1mM for 24 hours to 20° C reduced the DHAA, generating quantifying amounts of AA. This reduction effect is independent of the AA into the sample.

The soluble organic matter alters the bioavailability of heavy metals in solution, effect that depend of each element and it is expressed for changes in the concentration on the elements in leaves and root of the plants. In leaves the SOM decrease copper and cadmium concentration, raise the lead concentration and does not present an effect on nickel concentration. In the root the behavior is different, copper, lead, and nickel reduce their

concentration compared to the treatment with metal only and on the other hand cadmium raises its concentration.

The association between soluble organic matter and colloidal organic matter shows synergistic effect on the translocation of metals to leaves of the plant. This effect was observed for copper and cadmium due to a major diminution of its concentration in leaves compared with the application of SOM only. This effect was not observed in the root.

The effect of copper, cadmium, and lead over the systems glutathione/oxidized glutathione and ascorbic acid/dehydroascorbic acid in the plant, differs for each element and kind of tissue. For the peptides, the effect is expressed mainly in the root. Copper reduces the levels of both peptides and on the other hand lead and cadmium have an effect only on oxidized glutathione, with a diminution and increment, respectively. For the ascorbic acid/dehydroascorbic acid system, the three elements reduce slightly the ascorbic acid levels in leaves, whereas in root it was observed a diminution for copper only. The experiments in this study didn't show effects over the dehydroascorbic acid levels.

The association between soluble organic matter and metal in comparison with the metal only treatment leads to changes on the glutathione, oxidized glutathione and ascorbic acid levels. The major change was observed for cadmium which raised the glutathione and ascorbic acid levels in root. Respect to the lead, its association with SOM raised the levels of both peptides in root.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sistema GSH/GSSG y AA/ADHA en plantas y su respuesta al estrés por diversos factores ambientales.

Las Plantas están sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables para su normal desarrollo lo que globalmente se conoce como “estrés medioambiental”. Dentro de los tipos de estrés están: el estrés hídrico, salino, por temperatura, por exceso de luz, biológico, contaminantes gaseosos, herbicidas, y por exceso o carencia de elementos traza. Mediante la selección natural las plantas han adquirido una serie de mecanismos para enfrentar el estrés. En términos generales las plantas pueden responder frente al estrés de dos maneras: físicamente, tales como adaptaciones morfológicas o fisiológicas y bioquímicamente (Tudela y Tadeo 1993). Las condiciones de estrés en una planta siempre provocan estrés oxidativo ya que inducen una disminución de la fotosíntesis lo que disminuye la capacidad de disipación de energía y comienzan a incrementarse los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como anión súper oxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otras. Las ERO normalmente se producen durante la fotosíntesis, respiración, foto respiración y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en distintos tipos de compartimentos celulares tales como los cloroplastos y las mitocondrias (Mittler 2002). Por otro lado se ha visto que las ERO sirven como mensajeros intracelulares con el fin de provocar una defensa celular frente a un estrés biótico otorgándoles una función bioquímica más allá de la visión que se tenía como especies químicas tóxicas para las plantas cuya concentración debía ser mantenida lo más baja posible (Mittler 2002). Sin embargo, un desbalance de las ERO producidas por estrés puede provocar daño a la célula vegetal mediante el inicio de reacciones en cadena oxidativas de radicales, afectando moléculas orgánicas y generando peroxidación lipídica, inactivación de enzimas y degradación de ácidos nucleicos (Lamb y Dixon 1997).

Las células vegetales presentan tres líneas de protección que les permiten contrarrestar y eliminar el efecto nocivo de las ERO. La primera línea de defensa es mantener un estricto control de la producción de ERO, de este modo en la mitocondria la cadena transportadora de electrones es adecuadamente oxidada mediante la mantención del balance entre la disponibilidad y requerimientos de ATP. La segunda línea de defensa son los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los mecanismos enzimáticos, participan enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT), las que actúan en el ciclo Ascorbato-

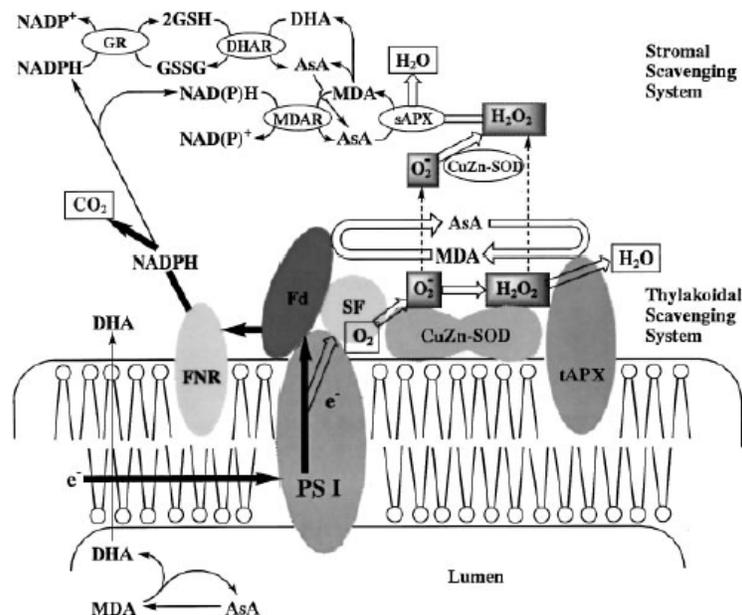
Glutación presente en cloroplastos, citosol, mitocondrias, apoplasto, y por otro lado la GPX y la CAT en los peroxisomas. Dentro de los mecanismos no-enzimáticos participan el Glutación Reducido (GSH), el Acido Ascórbico (AA), el  $\alpha$ -tocoferol, los carotenoides, flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos y aminoácidos no proteicos. Siendo el GSH y el AA los que participan de forma más activa en el proceso de eliminación de las ERO ya que participan en ambos mecanismos de protección (Enzimático y No Enzimático). (Asada 1999) (Figura 1). Finalmente la tercera línea de defensa es la reparación de las proteínas oxidadas (Gratao y col. 2005).

El glutación reducido es un tripéptido ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), soluble en agua, el cual posee múltiples funciones dentro de la célula: actúa como transportador y almacenador de azufre en forma reducida, captador de xenobióticos, ayuda a la detoxificación de metales pesados y a la defensa frente al estrés oxidativo y por exceso de luz (Tausz y col. 2004).

La síntesis de glutación ocurre en dos etapas consecutivas. La primera etapa es catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa, se sintetiza el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína a partir de glutamato, cisteína y ATP. Luego la enzima glutación sintetasa cataliza la adición de una molécula de glicina al extremo C-terminal del dipéptido anterior formando el glutación usando ATP (Maldonado 1993).

El ácido ascórbico (AA) sin embargo es una molécula pequeña de fórmula química  $C_6H_8O_6$ , su principal ruta de biosíntesis en plantas es por intermedio de la GDP-manosa, L-galactosa y la L-galactona-1,4-lactonadehidrogenasa. El AA posee importantes funciones en la planta además de las ya mencionadas tales como: co-factor en el ciclo de las xantinas, el ciclo de las enzimas deoxigenasas (involucradas en la síntesis de hidroxiprolina), etileno y un número de metabolitos secundarios, también participan en la división y crecimiento celular, siendo una de sus funciones más importantes su rol como antioxidante. (Smirnoff y col. 2001). Esta función como antioxidante puede ser primaria actuando directamente en distintos ciclos destinados a atrapar ERO anteriormente mencionados y secundaria regenerando el  $\alpha$ -tocoferol, un antioxidante adosado a la membrana del tilacoide (Cuypers y col. 2000).

Junto con la participación como sustrato en estos ciclos, el AA puede reaccionar con ERO y radicales orgánicos en el lumen pasando a Monodehidroascorbato (MDA), este al ser un radical de cierta estabilidad puede desproporcionar en el lumen como lo muestra la figura 1 según la siguiente ecuación:  $MDA + MDA \rightarrow \text{Ascorbato} + ADHA$ . La forma oxidada del AA el Acido dehidroascórbico ADHA puede atravesar la membrana del tilacoide hasta el estroma incorporándose al ciclo glutación-ascorbato.



**Figura 1:** Mecanismos en los que participan el GSH/GSSG y AA/ADHA/MDHA para desactivar ERO.

## 1.2 Efecto de metales sobre niveles de glutatión y AA

Los metales pesados como el Cobre, Cadmio, Plomo, entre otros, pueden entrar fácilmente a la planta en su forma soluble a través de la raíz. La biodisponibilidad de metales pesados para la planta depende de variables tales como, el tipo de suelo, pH, fuerza iónica y complejación por ligantes orgánicos e inorgánicos (Ashworth y Alloway 2007). La planta trata de evitar captar los metales a través de distintas estrategias: (a) Evitando físicamente las áreas contaminadas, (b) exudando agentes complejantes dentro de la rizosfera, (c) enlazando los metales pesados en la pared celular, (d) mediante afluencia del ión metálico desde el simplasma, (e) previniendo el transporte hacia la parte aérea del ión metálico desde la raíz, (f) complejando los iones metálicos en el simplasma, (g) transportando los iones metálicos complejados a la vacuola, (h) almacenando los iones metálicos en la vacuola por complejación con ligantes de la vacuola y (i) formando enzimas métralo-resistentes para minimizar el daño interno causado por su toxicidad (Hall 2002). La quelación de los metales en la célula es mediante péptidos ricos en cisteína llamados fitoquelatinas (PCs) de fórmula general ( $\gamma$ -Glu-Cys)-Xa en donde  $n = 2-11$ , dependiendo de la especie y el aminoácido, el carboxilo terminal puede ser Gly o  $\beta$ -Ala. Las fitoquelatinas comparten parte de la ruta

biosintética del GSH, ya que con el GSH y la  $\gamma$ -glutamilcisteína la enzima fitoquelatina sintetasa, las sintetiza (Tudela y Tadeo 1993)

Los efectos de los metales en las plantas depende tanto de la especie expuesta como de la concentración, tipo de metal, disponibilidad y tiempo de exposición a éste, los síntomas fisiológicos de toxicidad varían según cada especie e incluso entre individuos de la misma especie, además dependen también del estado de desarrollo en que se encuentre la planta, pero los síntomas más comunes y no específicos de la fitotoxicidad por metales a nivel fisiológico son: la clorosis o puntos cafés y líneas cafés en los márgenes de las hojas y un crecimiento dispar de la raíz, y a nivel bioquímico son: la peroxidación lipídica, además de otras alteraciones que provocan la muerte celular, generando con esto pérdida de masa, por muerte celular.

Por otro lado, la respuesta de estos antioxidantes a estrés por metales pesados ha presentado variabilidad en los resultados expuestos en la literatura debido a que: (a) Los metales pesados ejercen diferentes mecanismos de estrés, (b) a su vez los mecanismos antioxidantes están compartimentalizados y en consecuencia existen diferentes respuestas entre organelos, células y tejidos, (c) también la detoxificación por quelación de los metales reduce la inducción de estrés oxidativo. (Schutzendubel y col. 2001) Sin embargo, un reciente estudio indicó que una elevada concentración de GSH esta fuertemente correlacionado con la habilidad de las plantas de soportar estrés inducido por metales (Freeman y col. 2004).

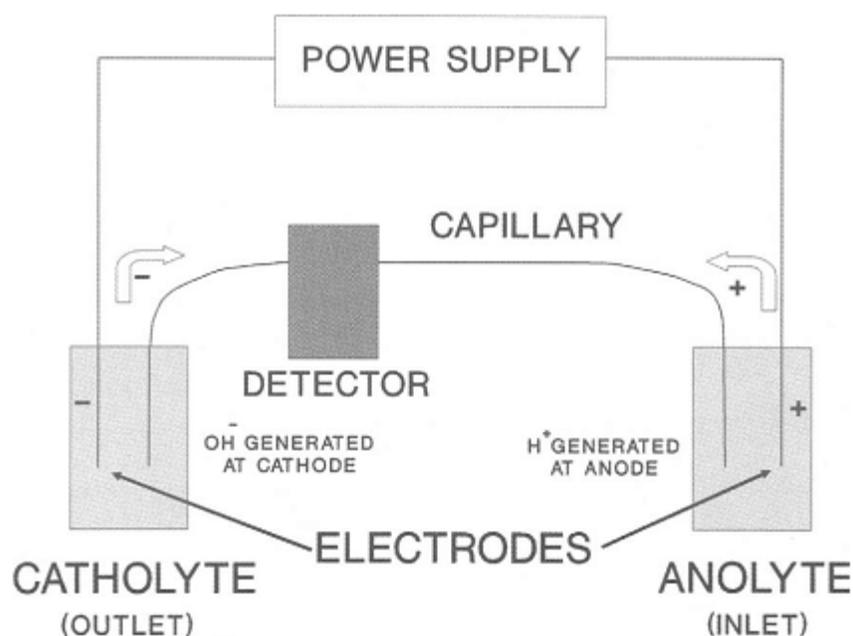
### **1.3 Análisis de GSH/GSSG y AA/ADHA en matrices vegetales.**

En la literatura se han reportado distintas formas de analizar el GSH y GSSG. El glutatión se puede analizar como tiol total (Anderson y col. 1992). También mediante determinación espectrofotométrica a 412 nm por ensayo de enzima-reciclaje, basado en la oxidación secuencial de GSH con ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) y reducción por NADPH, en presencia de cantidades conocidas de glutatión reductasa, luego para cuantificar el GSSG se usa el 2-vinilpiridina. (Griffith 1980). También es muy usada la cromatografía de líquidos para cuantificar GSH y su forma oxidada, el GSSG por diferencia mediante el uso de un reductor, la separación se efectúa en fase reversa con una columna C-18. (Semane y col. 2007). En el caso del AA, se han reportado diversos métodos para su análisis como cromatografía de líquidos (Lykkesfeldt 2000; Perez-Ruiz y col. 2004; Wolucka y col. 2001), voltametría (Strochkova y col. 1997), calorimetría (Antonelli y col. 2002) y titulación (Washko

y col. 1992). Sin embargo, en el último tiempo se ha usado ampliamente la electroforesis capilar de zona (ECZ) para el análisis de GSH/GSSG y AA/ADHA (Herrero-Martinez y col. 1998; Mendoza y col. 2004) debido al corto tiempo de análisis, pequeño volumen de muestra requerido, del orden de los  $\mu\text{L}$ , alta eficiencia en separación y simpleza en su operación.

#### 1.4 Electroforesis capilar

La ECZ capilar es una técnica basada en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño ( $10\text{-}200\mu\text{m}$ ), algunas ventajas de usar estos capilares son: (a) el calor generado al pasar la corriente eléctrica es bien disipado, (b) en consecuencia puede aplicarse alto voltaje y reducir el tiempo de análisis. La instrumentación del equipo es muy básica, consta de una fuente de voltaje, un capilar, recipientes de muestra, el ánodo y cátodo y un detector (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema de un instrumento de Electroforesis Capilar de Zona

En cuanto a los fundamentos de la separación:

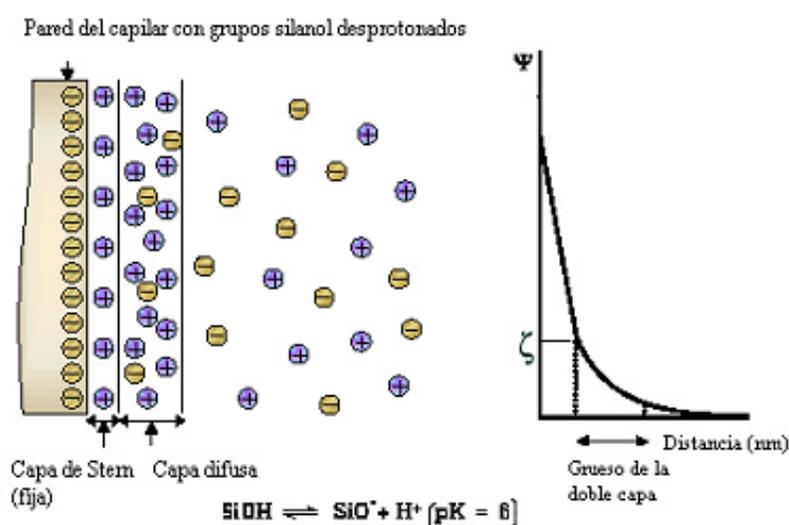
La velocidad de un ión sometido a la acción de un campo eléctrico viene dada por la expresión:

$$V = \mu_{ep} E \quad (1.1)$$

Donde ( $\mu_{ep}$ ) es la movilidad electroforética del ión, y E el campo eléctrico aplicado,  $\mu_{ep}$  depende a su vez de la carga del ión (q), de su radio (r) y de la viscosidad de la solución ( $\eta$ ), según la expresión.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.2)$$

La velocidad con la que viaja un determinado ión es mayor cuanto mayor es su carga y menor es su radio. No obstante la movilidad electroforética no coincide con lo predicho por la ecuación 1.1, debido a la existencia del flujo electrosmótico (EOF), que es el flujo del líquido al interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de los capilares de sílice fundida (como el usado en este trabajo) esta superficie de carga es generada por la ionización de los grupos silanol, esto hace que la superficie interna del capilar atraiga hacia sí iones positivos que forman una capa adyacente fija por adsorción (capa de Stern), y una capa difusa y móvil también positiva (capa de Guy-Chapman). Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Estos iones al estar solvatados generan un movimiento global del fluido hacia el cátodo. Este movimiento del flujo constituye el EOF (Figura 3).



**Figura 3:** Formación de la doble capa electroquímica que genera el EOF

Por otro lado la movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) viene dada por la siguiente ecuación:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta} \quad (1.3)$$

Donde  $\eta$  y  $\varepsilon$ , son la viscosidad y la constante dieléctrica de la solución, respectivamente y  $\xi$  es el potencial zeta. El potencial zeta es el potencial existente en el plano de la separación de ambas capas y depende de la naturaleza y cantidad de iones en la superficie interna del capilar. Este potencial decrece de forma lineal dentro de la capa de Stern, pero decrece exponencialmente dentro de la capa difusa (Figura 3). La ecuación 1.3 da cuenta que la movilidad del flujo electroosmótico depende solamente de características del electrolito como la constante dieléctrica, viscosidad, pH y concentración y es independiente del campo aplicado.

Cuando se forma la EOF se modifica la velocidad total con la que los iones se mueven a través del capilar de la forma:

$$V = (\mu_{eo} \pm \mu_{ep}) E \quad (1.4)$$

El término ( $\mu_{eo} \pm \mu_{ep}$ ), se denomina movilidad aparente ( $\mu_a$ ) y puede calcularse a partir de datos experimentales según:

$$\mu_a = \frac{lL}{tV} \quad (1.5)$$

Siendo, ( $l$ ) la longitud efectiva medida desde el extremo del *inlet* a la ventana de detección, ( $L$ ) la longitud total del capilar, ( $t$ ) el tiempo de migración del analito y ( $V$ ) el voltaje aplicado. Si el EOF es mayor que las movilidades electroforéticas ( $\mu_{ep}$ ) de los aniones estos se pueden separar en una misma inyección junto a los cationes y las moléculas neutras contenidas en la muestra. Los cationes son atraídos electroforéticamente hacia el polo negativo y a esta velocidad se le suma la del EOF, en el mismo sentido. Todas las moléculas

neutras migran a la velocidad del EOF y por último los aniones migran con una velocidad igual a la diferencia entre la velocidad del EOF y sus velocidades electroforéticas hacia el ánodo. La diferencia en los tiempos de migración dentro del grupo de cationes o de aniones viene dada por la diferencia en sus movilidades electroforéticas. En cuanto a los detectores que pueden ser usados en el equipo varían en cuanto a su sensibilidad, especificidad y costo, los hay de UV-VIS, Fluorescencia, Potenciometría, Amperometría y espectroscopia de masa entre otros (Weinberger 2000).

### **1.5 Materia orgánica soluble (MOS)**

En el año 1993, se instaló en la Región Metropolitana, la primera Planta de Tratamiento de Aguas Servidas, en Melipilla, en el marco de un gran proyecto que prevé para el año 2010 que esta planta, junto con las plantas de “El Trebal” (2001) y “La Farfana” (2003) traten el 100 % de las aguas servidas de la región metropolitana.

Como producto de estas plantas de tratamiento de aguas servidas se obtienen el agua tratada y como sub-producto los “biosólidos Residuales”. El agua tratada puede servir directamente para el uso de la agricultura, mientras que los biosólidos sirven como una fuente de materia orgánica, N y P a bajo costo en la agricultura para enriquecer la calidad del suelo, también contienen material inorgánico y orgánico, además de metales traza y cierta cantidad de patógenos. Sin embargo la posible presencia de metales pesados en los biosólidos en concentraciones que excedan a las encontradas naturalmente en el suelo es motivo de preocupación para su aplicación en suelos agrícolas (Oliver y col. 2005). Es por eso que se ha normado y regulado la calidad de los lodos sanitarios, regulando también la cantidad máxima permitida de metales en los lodos para la cual se ha elaborado la Norma Chilena (NCh-2952).

Por otro lado, la distribución de metales pesados encontrados en la materia orgánica de los biosólidos dependen del tipo de tratamiento que han tenido las aguas residuales tratadas (Ilani y col. 2005) y varían según si el tratamiento de digestión fue aeróbico o anaeróbico. En este trabajo se usaron biosólidos pertenecientes a la planta de tratamientos de “El Trebal” que utiliza el proceso de “Lodos Activados” y biosólidos de la planta “Vallena” que los produce mediante el proceso de “Laguna de Estabilización”.

Junto con la presencia de metales en los biosólidos en concentraciones fitotóxicas otro aspecto preocupante es la movilidad que estos puedan tener, ya que se ha demostrado mediante experimentos con suelos que los metales mediante distintos procesos de desorción

umentan su movilidad pudiendo después de un tiempo movilizarse a través del perfil del suelo. La mayor movilidad que adquieren los metales en los suelos, después de que éstos son acondicionados con biosólidos se ha atribuido a la presencia de microorganismos propios de los biosólidos que degradan la materia orgánica presente en estos generando probablemente una fracción de bajo peso molecular y por ende más móvil (Mendoza y col. 2004) con una mayor capacidad de desorber metales (Garrido y col. 2004), en consecuencia los metales se transportan a través del perfil del suelo ayudados por la MOS presente en la materia orgánica de los biosólidos (Ashworth y Alloway 2004), punto importante considerando la mayor cantidad de materia orgánica presente en el biosólido con respecto al suelo, encontrándose cantidades de entre un 20 % y 60% de materia orgánica en los biosólidos, dependiendo del proceso de obtención (Granato y col. 2004).

La materia orgánica soluble es muy heterogénea en tamaño y composición. La masa molecular de la MOS varía desde menos de 500 a más de 5000 Da (Imai y col. 2002) y es una mezcla de materiales húmicos, polisacáridos, polifenoles, proteínas, lípidos y moléculas heterogéneas. Debido a su carga neta negativa que la MOS tiene en un suelo a un pH típico (6-7), esta es muy móvil a través del suelo (Dunnivant y col. 1992). Además la MOS tiene una gran capacidad de intercambio iónico y de formar complejos solubles con los metales presentes tanto en el biosólido como en el suelo (Xiaoli y col. 2007), por ejemplo el cobre es un metal que ha mostrado tener una fuerte asociación con la MOS (Karlsson y col. 2006) y se ha demostrado que la movilidad del cobre a través del suelo fue incrementada con la aplicación de biosólidos pudiendo contribuir a la contaminación del suelo (Ashworth y Alloway 2004).

En el caso del cobre este para poder ser complejado necesita estar entre pH 4 y 7. El pH del suelo normalmente es de 6.0 quedando dentro del rango de pH en que se puede complejar cobre (Ashworth y Alloway 2007). Por otro lado, los metales pueden sufrir variados procesos e interacciones químicas con las distintas fracciones del suelo, alterando su movilidad en el suelo así como también su biodisponibilidad para las plantas, estas interacciones pueden ser con el suelo, la materia orgánica presente (soluble e insoluble) y con microorganismos. Además las interacciones MOS-metal-planta y metal-planta son distintas y están regidas por diversos factores.

## 1.6 Absorción y translocación de metales en las plantas

La absorción de metales por parte de la planta va estar determinada por su biodisponibilidad, esta se define como el grado en el cual los compuestos químicos presentes en el medio pueden ser absorbidos o metabolizados por receptores biológicos o que estén disponibles para sistemas biológicos. Por otro lado la definición de biodisponibilidad no tiene una definición explícita en cuanto a su cantidad física. Sin embargo para propósitos prácticos se le ha dado definiciones más conceptuales tales como: (i) La cantidad de compuestos químicos en el medio que están presentes en formas y cantidades en las cuales las plantas y otros organismos puedan incorporarlos durante su periodo de vida y (ii) La velocidad a la cual un compuesto químico puede ser transportado a una población biológica específica. Por lo tanto se podría agrupar en términos de flujo o velocidad ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en términos de concentración ( $\text{mol kg}^{-1}$ ) como en este trabajo (ISO/DIS 17402).

Es necesario enfatizar que los rangos de concentración de los elementos traza requeridos por las plantas son cercanos al de la concentración que es peligrosa para el metabolismo de la planta por lo que no es fácil hacer una división clara entre una concentración suficiente y en exceso. A pesar de la diversidad reportada sobre los niveles de toxicidad, puede establecerse para plantas superiores y ciertos microorganismos que los metales más tóxicos son: Hg, Cu, Ni, Pb, Co, Cd, y posiblemente también, Ag, Be, y Sn (Kabata-Pendias 2001).

La absorción de metales por parte de la planta puede involucrar dos procesos, el pasivo y el activo. El proceso pasivo es la difusión de los iones desde una solución externa hasta la endodermis de la raíz. Mientras que el proceso activo requiere energía metabólica y va en contra del gradiente químico. En condiciones normales la raíz junto a microorganismos asociados producen varios componentes orgánicos que son muy efectivos en liberar los metales firmemente fijados al suelo (Kabata-Pendias2001).

Los mecanismos de absorción para los metales varían según el metal. Pb y Ni son preferentemente absorbidos pasivamente, en tanto que para el Cu, Mo y Zn su absorción es activa. Sin embargo cuando las propiedades biológicas y estructurales de la raíz se ven alteradas todos los elementos son tomados pasivamente (Kabata-Pendias2001).

En general la absorción de los elementos traza por la planta es afectada (además de la habilidad específica de cada planta) por los factores del suelo tales como: el pH (que es el más importante), régimen del agua, contenido de arcilla, contenido de materia orgánica,

capacidad de intercambio catiónico, balance de nutrientes y concentración de otros elementos traza (Kabata-Pendias2001).

Una vez que la planta absorbe cualquier nutriente o elemento traza del suelo, su transporte dentro de la planta involucra tres procesos: movimiento a través del xilema, movimiento a través del floema, y la acumulación o inmovilización (Kabata-Pendias 2001).

La tolerancia real de las plantas a exceso de metales esta condicionada a factores internos que consisten de varios procesos metabólicos tales como: (a) Absorción selectiva de iones, (b) Disminución en la permeabilidad de las células de la pared de la raíz, (c) Activación de sistemas enzimáticos para prevenir efectos adversos, (d) Adaptación a la toxicidad del metal reemplazando un metal fisiológico en una enzima, (e) Liberación o excreción de iones por distintas partes de la planta entre ellos la raíz, y (f) Liberación de componentes volátiles orgánico-metálicos (Kabata-Pendias 2001).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la materia orgánica soluble y coloidal de los biosólidos sobre la biodisponibilidad de metales pesados y los niveles de ácido ascórbico y glutatión en plantas

### 2.2 Objetivos Específicos

- i) Establecer un método mediante electroforesis capilar de zona para cuantificar ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico en tejido vegetal, optimizando las condiciones de análisis y de reducción del ácido dehidroascórbico.
- ii) Determinar la cantidad de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, glutatión reducido y glutatión oxidado en las plantas y relacionar su concentración al estado de estrés por cobre, plomo y cadmio en solución.
- iii) Evaluar el efecto de la materia orgánica soluble y coloidal sobre la biodisponibilidad de cobre, plomo, cadmio y níquel en las plantas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Soluciones y estándares

##### 3.1.1 Electrolitos de corrida para electroforesis capilar

Se preparo una solución stock de borato 0,5 M, a partir de la cual se preparo diariamente el electrolito de corrida según el analito a analizar. Para el análisis de GSH y GSSG se diluyeron 60 mL de la solución stock a un volumen de 100 mL y se le ajustó el pH con NaOH 0,1M, obteniéndose una solución de borato 0,3M a los pH 7,6 y 7,8. Para el análisis de AA y ADHA de igual forma se prepararon soluciones de borato 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M a los pHs 7,6; 7,8 y 8. Todas las soluciones fueron finalmente filtradas por membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.2 Estándares de los analitos.

Los estándares de GSH y GSSG (sigma) se prepararon a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , para ello se pesaron 3,84 mg y 7,66 mg, respectivamente. El estándar de AA (sigma) se preparó a una concentración de 100 mg/L, pesando 2,5 mg. Todos los estándares se pesaron en una microbalanza marca Sartorius, siendo luego aforados a un volumen final de 25 mL con MPA al 2% o 5% según el tipo de análisis.

Para preparar el estándar de ADHA (aldrich) se pesaron 2,5 mg en una microbalanza marca Sartorius y se llevó a un volumen de 25 mL con MPA al 2%, luego esta solución se calentó con agitación en una placa calefactora a 40° C por 24 hrs. luego fue filtrada por membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.3 Agentes para la reducción de ADHA a AA

**Hidroxilamina:** Se pesó 1 g. de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (merck) y se llevó a un volumen de 100 mL con agua MilliQ para obtener una concentración de 1% p/p.

**Mercaptoetanol:** Se midió un volumen necesario de 2-mercaptoetanol (merck) para lograr la concentración deseada en % v/v, las concentraciones usadas fueron de 1-1,5-2-2,5-3-3,5.

**Tris [2-carboxietil] fosfina (TCEP):** Se pesaron 35,83 mg de TCEP (pierce) en una microbalanza marca Sartorius y se preparó de dos formas distintas según su uso. Por un lado la cantidad pesada se llevó a un volumen de 25 mL con MPA 2% quedando una concentración de 5 mM en TCEP, y por otro lado, se preparó otra solución de TCEP 5 mM en una solución de borato 0,2 M a pH 7,8. Ambas soluciones fueron finalmente filtradas por membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **3.1.4 Preparación de estándares de calcio, magnesio, fósforo, potasio y metales**

La cuantificación de Ca, Mg, Cu, Cd, Ni y Pb se realizó por espectroscopia de absorción atómica (EAA), para lo cual en el se prepararon curvas estándar de acuerdo al rango sugerido en el manual de instrumento (Perkin Elmer, modelo 3110).

Para la cuantificación de fósforo se utilizó el método del azul de molibdeno, usando ácido ascórbico como reductor. El fósforo en el extracto se analizó por colorimetría (Sadzuka y col. 2000). Para la medición se utilizó un espectrofotómetro U.V. visible UNICAM UV2 a una longitud de onda de 880 nm. La determinación de Potasio se hizo en un fotómetro de llama marca Jenway PFP 7.

## **3.2 Curvas de Calibración y Límites de Detección**

Para las curvas de calibración de GSH y GSSG, se utilizaron soluciones estándares de 500  $\mu\text{M}$  en MPA 2% y 5%. Cada punto se preparó mezclando la cantidad necesaria de estándar de GSH y GSSG, agregándole 800  $\mu\text{L}$  o 600  $\mu\text{L}$  de electrolito y una cantidad variable de MPA 2% o 5% respectivamente según corresponda para completar 1000  $\mu\text{L}$  y 700  $\mu\text{L}$ . Logrando así un factor de dilución en la concentración de MPA 2% o 5% de 1:5 o 1:7 respectivamente en el volumen final. Para la curva en MPA 2% se consideraron 7 puntos de 2,5; 3,5; 5, 10, 20, 40 y 50  $\mu\text{M}$  de cada analito y para la curva en MPA 5% se consideraron 5 puntos de 5, 10, 15, 20, 30  $\mu\text{M}$  de cada analito.

Con el AA se utilizaron soluciones estándares de 100 mg/L de AA en MPA 2% y 5%. Cada punto se preparó mezclando la cantidad necesaria de estándar de AA, agregándole 800  $\mu\text{L}$  de electrolito y una cantidad variable de MPA 2% o 5% según corresponda para completar 1000  $\mu\text{L}$ , logrando siempre una dilución en la concentración de MPA 2% y 5% en un factor de 1:5. Para la curva en MPA 2% se consideraron 4 puntos de 1, 2, 3 y 5 mg/L de cada analito. Para la curva en MPA 5% se consideraron 5 puntos de 2, 3, 4, 5 y 7 mg/L de cada analito.

Se considero el límite de detección como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco o ruido de fondo,  $Y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco  $S_B$  (Miller y Miller 2002)

$$Y_{\text{est}} = Y_B + 3S_B \quad \text{Donde } Y_{\text{est}} \text{ es el valor estimado de } Y \text{ en el límite de detección.}$$

Un supuesto estadístico fundamental del método de los mínimos cuadrados sin ponderar es que cada punto en la representación grafica, incluido el que representa al blanco o ruido de fondo, tiene una variación distribuida normalmente con una desviación estándar estimada por  $S_{Y/X}$ , por lo tanto es apropiado utilizar  $S_{Y/X}$  en lugar de  $S_B$  en la estimación del límite de detección.

$$A = Y_B$$

$$DE = S_{Y/X} = S_B$$

Luego de obtenida cada curva y de acuerdo a la ecuación de regresión se utilizaron los valores de intercepto (A), pendiente (B) y desviación estándar (DE) para el cálculo de los respectivos límites de detección. El cálculo se hizo de acuerdo a las siguientes fórmulas.

$$Y_{\text{est}} = A + 3DE \quad \text{Además,} \quad Y_{\text{est}} = BX + A$$

Donde X corresponde al límite de detección.

### **3.3 Sistema de electroforesis capilar**

Se utilizó un equipo de Electroforesis Capilar de Zona marca Waters Quanta 4000E con detección fotométrica directa a la longitud de onda deseada, mediante una lámpara de mercurio. Se trabajó con fuente de poder positiva, inyección hidrostática de 30 segundos y un capilar de 40 cm. x 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, los que fueron previamente acondicionados en 4 etapas: 5 minutos con KOH 2M, 5 minutos con KOH 0,5M, 5 minutos con Agua MilliQ y 5 minutos con la solución electrolito a usar. La temperatura de trabajo fue mantenida en 25° C.

### **3.4 Optimización de los parámetros instrumentales y de preparación de la muestra**

Las muestras a analizar, las cuales se encontraban congeladas en N<sub>2</sub> líquido en viales criogénicos, fueron trasladadas a un mortero previamente enfriado con N<sub>2</sub> líquido, se trituraron lo más finamente posible, lentamente para no perder muestra y agregando más N<sub>2</sub> para mantener baja la temperatura, luego se les agregó 2 mL de MPA al 2% o 5% según corresponda y se siguió triturando hasta formar una suspensión, que luego se trasladó a viales Eppendorf de 1,5 mL siendo posteriormente centrifugadas en un centrífuga Heraeus Sepatech modelo Biofuge 28RS a 10000 rpm por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido se extrajo con una jeringa y se trato de dos maneras distintas: Para el tratamiento en que se extrajo la muestra con MPA 2 % el sobrenadante se congeló en viales de 1,5 mL a -14°C, para su posterior filtración antes del análisis. Para el tratamiento con MPA 5 %, las muestras se filtraron primero y luego se congelaron en viales de 1,5 mL a -14°C. En ambos casos las muestras fueron filtradas por membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  y luego analizadas por ECZ. Cada muestra contenía aproximadamente 1 g. de tejido fresco de la parte aérea o raíz de la planta.

### 3.5 Obtención de la MOS y MOC

Para el estudio se trabajó con 2 biosólidos obtenidos mediante procesos distintos, uno obtenido por proceso de digestión anaeróbica (El trebal) y el otro por proceso en lagunas de estabilización facultativa (Vallendar). Para ambos biosólidos la MOS se obtuvo por extracción acuosa en razón 1:10 biosólido: agua en tubos de polietileno de 50 mL para centrifuga. La mezcla fue agitada por 24 h. en un agitador oscilante marca Bhanu Gel-Rocker-50, a temperatura ambiente. La suspensión fue luego centrifugada por 10 min. a 4000 rpm en una centrifuga marca MINOR modelo BS-349. El sobrenadante obtenido del biosólido (El trebal) se trató de dos maneras: Una parte fue filtrada por papel filtro de tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  y luego membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ , obteniéndose la materia orgánica soluble (MOS1). La otra parte fue filtrada solo por papel filtro de tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ , obteniéndose la materia orgánica soluble junto con la coloidal (MOC). En el caso del biosólido (Vallendar), el sobrenadante obtenido fue filtrado por papel filtro de tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  y luego por membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ , obteniendo su materia orgánica soluble (MOS2). Tanto la MOS como la MOC obtenidas fueron guardadas en frascos de vidrio en el refrigerador.

### 3.6 Cultivo de plantas y tratamiento con materia orgánica y metal

Para la obtención de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) se germinaron semillas en arena de río en un incubador con temperatura controlada de 25° C y ausencia de luz, siendo regadas periódicamente. Después de 10 días de crecimiento de las plántulas, se eligieron 6 de tamaño y aspecto similar y se trasladaron a un recipiente plástico de 1 L de capacidad que contenía solución nutritiva. Cada tratamiento consistió de cuatro recipientes de 1 L. Los recipientes con las plántulas se mantuvieron durante todo el experimento en una cámara climática bajo las siguientes condiciones controladas de luz, humedad y temperatura: 10 horas a 18° C, 0  $\mu\text{einsteins/m}^2\text{s}$ ; 1 hora a 21° C, 280  $\mu\text{einsteins/m}^2\text{s}$ ; 12 horas a 24° C, 480  $\mu\text{einsteins/m}^2\text{s}$  y 1 hora a 21° C, 280  $\mu\text{einsteins/m}^2\text{s}$ . Se mantuvo una humedad relativa constante de 50%. Luego de 21 días de crecimiento en solución nutritiva las plantas se trataron con solución nutritiva que contenía metal o bien con MOS o MOC más metal. Transcurridas 48 h. se sacaron las plantas de los recipientes, se les lavó la raíz con agua MilliQ, se secaron con papel absorbente y después de esto se les

extrajo muestras de hojas y raíz de 1g aproximadamente, que fueron puestas en viales criogénicos e inmediatamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido, para su posterior tratamiento. El resto de la planta fue separado en parte aérea y raíz, se pesaron y ambas se secaron en una estufa a 60° C por 48 horas, siendo posteriormente pesadas nuevamente. El material vegetal se molió en un molino marca IKA A11 basic y almacenadas en frascos de polietileno, para su análisis en metales pesados y macronutrientes.

Se realizaron 2 experimentos con plantas, en el primero los tratamientos fueron: Control, Cu 50 µM, Pb 50 µM, MOS1, MOS2, Cu 50 µM + MOS1, Cu 50 µM + MOS2, Pb 50 µM + MOS1, Pb 50 µM + MOS2. En el segundo experimento los tratamientos fueron: Control, Cu 50 µM, Cd 4 µM, Ni 50 µM, Cu 50 µM + MOS1, Cd 4 µM + MOS1, Ni 50 µM + MOS1, Cu 50 µM + MOC, Cd 4 µM + MOC, Ni 50 µM + MOC1 En ambos casos para el crecimiento de las plantas se uso solución nutritiva de la siguiente composición: N 7,4 (8:1 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), K 1,2; Ca 2,2; Cl 0,06 en mM. Fe (como Fe-EDTA) 19,5; B 15, Mn 5,4; P 20; Zn 1,4; Mo 0,5; Cu 0,4 en µM. a esta solución se le ajustó el pH a 6,0 con NaOH 0,1 M (Mendoza y col. 2004).

### **3.7 Análisis de GSH/GSSG y AA/ADHA**

Para el análisis con MPA 2% tanto para el GSH, GSSG y AA se tomaron 200 µL de muestra que se pusieron en un vial de 1,5 mL y se le agrego 800 µL de electrolito (factor de dilución 1:5), se agito en un vortex marca Stuart Scientific SA5 y de los 1000 µL de solución resultante se tomaron 200 µL que fueron puestos en viales de 0,6 mL, los que se ponían directamente en el equipo de ECZ seguido de su inmediato análisis.

Para el análisis con MPA 5% en el caso del GSH y GSSG se tomaron 100 µL de muestra que se pusieron en un vial de 1,5 mL y se le agrego 600 µL de electrolito (factor de dilución 1:7), se agitó en un vortex marca Stuart Scientific SA5 y de los 700 µL de solución resultante se tomaron 200 µL que fueron puestos en viales de 0,6 mL, los que se ponían directamente en el equipo de ECZ seguido de su inmediato análisis. En el caso del AA siguió el mismo procedimiento que con MPA 2%.

### **3.8 Análisis de metales en las plantas**

Para el análisis de metales en la planta, la muestra fue sometida a digestión ácida, para ello se pesaron aproximadamente 400 mg de parte aérea o raíz seca y molida se trasladaron a vasos de teflón para microondas, luego se le agregó 4 mL de  $\text{HNO}_3$  (pa) y 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% v/v, posteriormente se digirieron en un horno microondas Milestone MLS 1200 Mega usando un programa de cinco etapas: etapa 1, 1 min. a 125 W; etapa 2, 2 min. a 0 W, etapa 3, 5 min. a 250 W, etapa 4, 6 min. a 400 W y etapa 5, 6 min. a 600 W. Finalmente los extractos se llevaron a un volumen final de 20 mL con agua MilliQ, se filtraron por papel filtro cuantitativo y se guardaron en frascos de polietileno para su análisis.

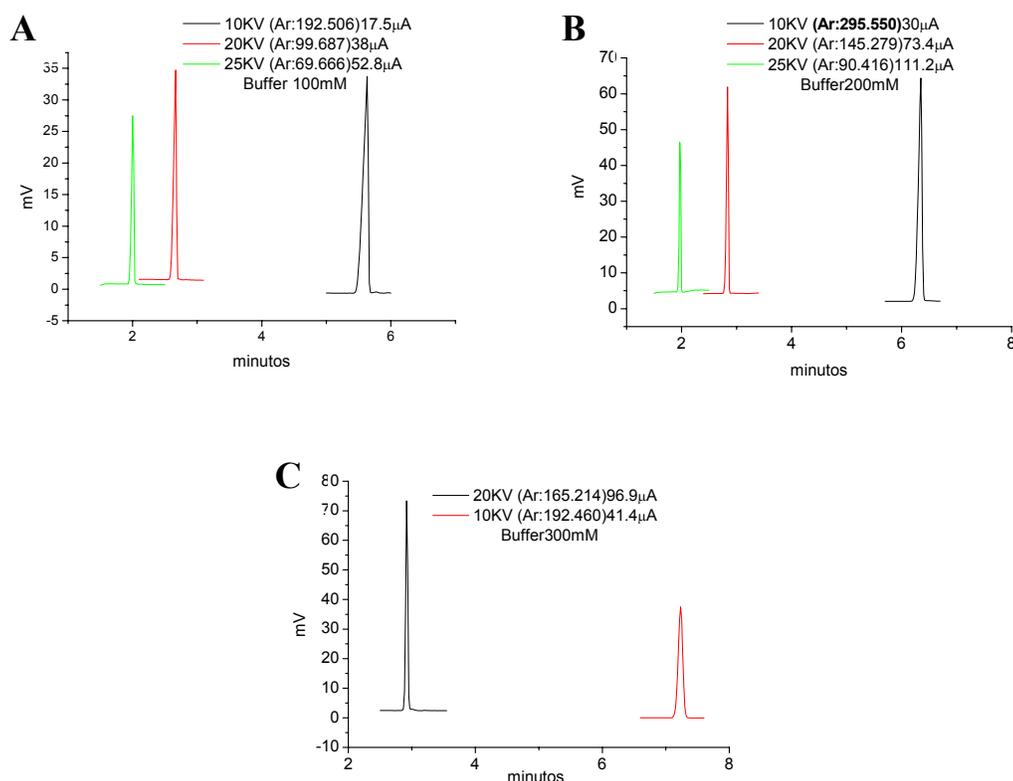
### **3.9 Análisis estadístico**

Para obtener la información acerca de diferencias significativas entre los datos obtenidos se efectuaron análisis de varianza entre los valores medios de los tratamientos así como también en algunos casos el contraste t para datos pareados. El análisis se llevó a cabo mediante el software microcal origin 7.0 para Windows.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Optimización de las condiciones instrumentales para el análisis de AA/ADHA.

Se evaluaron los factores que influyen en el análisis de Acido Ascórbico por ECZ con el fin de optimizar un método para análisis de tejido vegetal (hojas y raíces), para esto se utilizó un capilar de sílice fundida, recubierto con poliimida de 40 cm de largo. Las concentraciones de borato usadas fueron 100, 200 y 300 mM. La concentración de estándar fue de 20mg/L preparado en MPA 2%. En la figura 5 se aprecia el efecto del voltaje de corrida y concentración del electrolito.



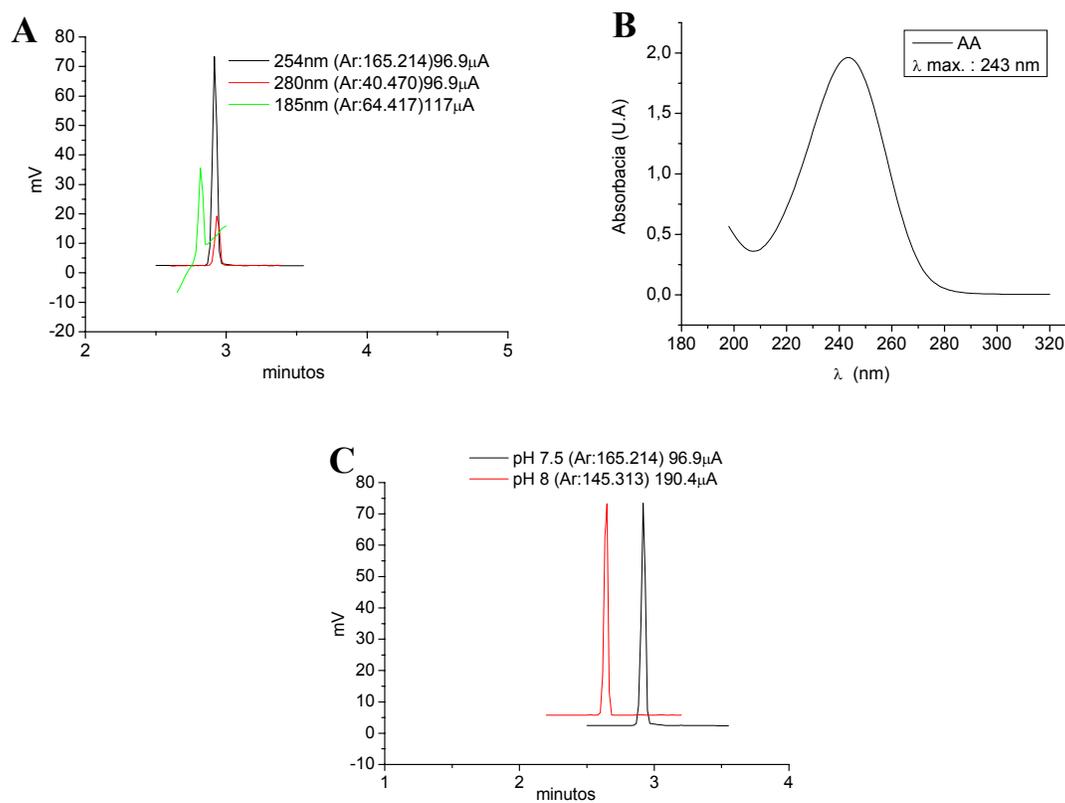
**Figura 5:** Efecto del Voltaje aplicado y concentración de borato sobre el área, tiempo de migración y corriente generada a  $\lambda = 254 \text{ nm}$  y pH 7,5.

Se observó una notoria disminución del tiempo de corrida al aumentar de 10 a 20 kV y solo una leve disminución al aumentar de 20 a 25 kV. El área registrada tuvo un efecto

inverso con el voltaje aumentando notoriamente con la disminución del voltaje, registrándose la mayor área a 10kV con una concentración de electrolito de 200 mM.

La corriente registrada fue directamente proporcional al voltaje usado y la concentración del electrolito ( $r = 0,988$  a 200mM borato) razón por la cual no fue posible registrar el área a 25 kV con una concentración de electrolito de 300 mM, debido al gran aumento de la corriente lo que puede provocar la electrólisis del agua generando burbujas las que generan a su vez picos falsos, además de la posible descomposición de la muestra o el electrolito soporte.

La intensidad de la señal a distintas longitudes de onda se encontró en directa relación a la intensidad de las bandas de absorción del AA (Figura 6A y B), además se obtuvo una mayor señal para el AA a pH 7.5 y corriente más baja que a pH 8 debido a la menor disociación del AA (Figura 6C).

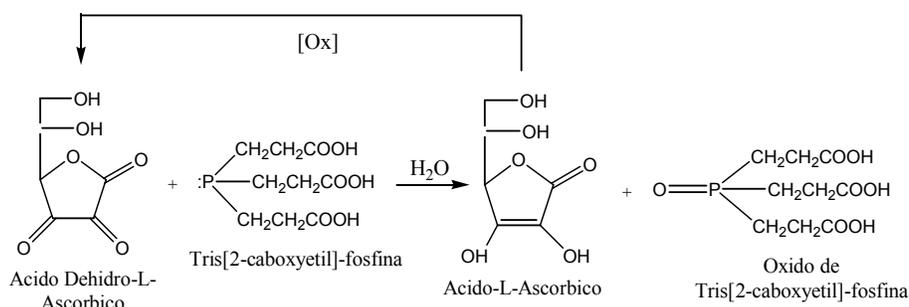


**Figura 6:** Respuesta del equipo de ECZ para AA a (A) distintas  $\lambda$  (nm) con borato 200mM y 20kV a pH 7.5, (B) Espectro de absorbancia para AA y (C) efecto del pH a 20kV con borato 200mM

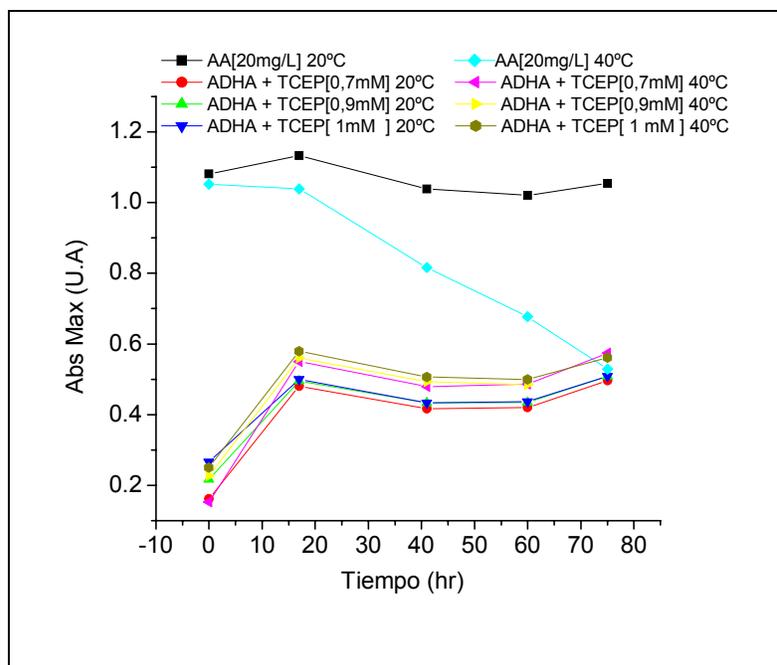
Basado en las áreas obtenidas para cada señal se encontró entonces que las condiciones óptimas para análisis del AA fueron con una concentración de borato 200 mM, 10 kV, pH 7,5 y  $\lambda = 254$ .

## 4.2 Reducción de ADHA a AA

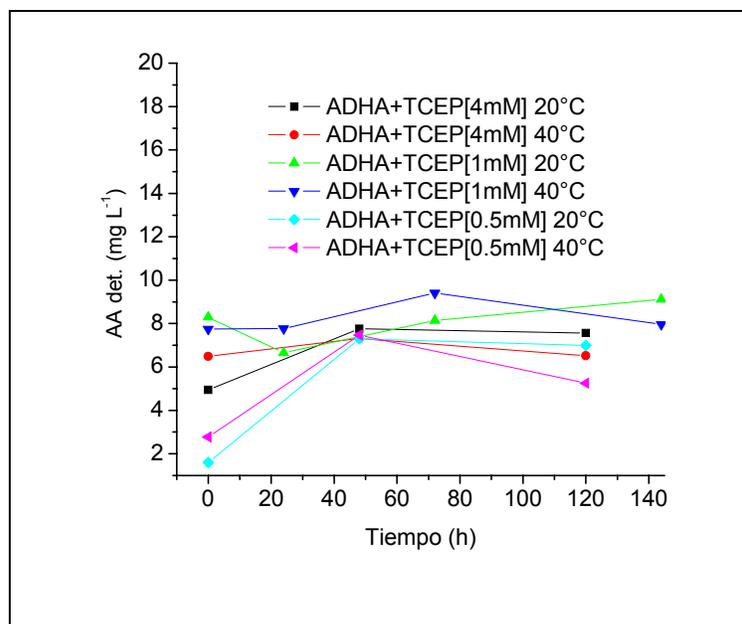
Se probaron diferentes agentes reductores para reducir el ADHA existente en la muestra a AA, los agentes reductores probados fueron el 2-mercaptoetanol, la hidroxilamina, y el Tris [2-carboxietil] fosfina (TCEP), dentro de estos reductores el único que logró reducir el ADHA en las condiciones de análisis fue el TCEP mediante la siguiente reacción:



**Figura 7:** Mecanismo de reacción del TCEP para la reducción de ADHA a AA



**Figura 8:** Análisis por Espectrofotometría UV-Vis. de la conversión de ADHA [20mg/L] a AA con TCEP a diferentes concentraciones y su estabilidad a 20 y 40 °C.

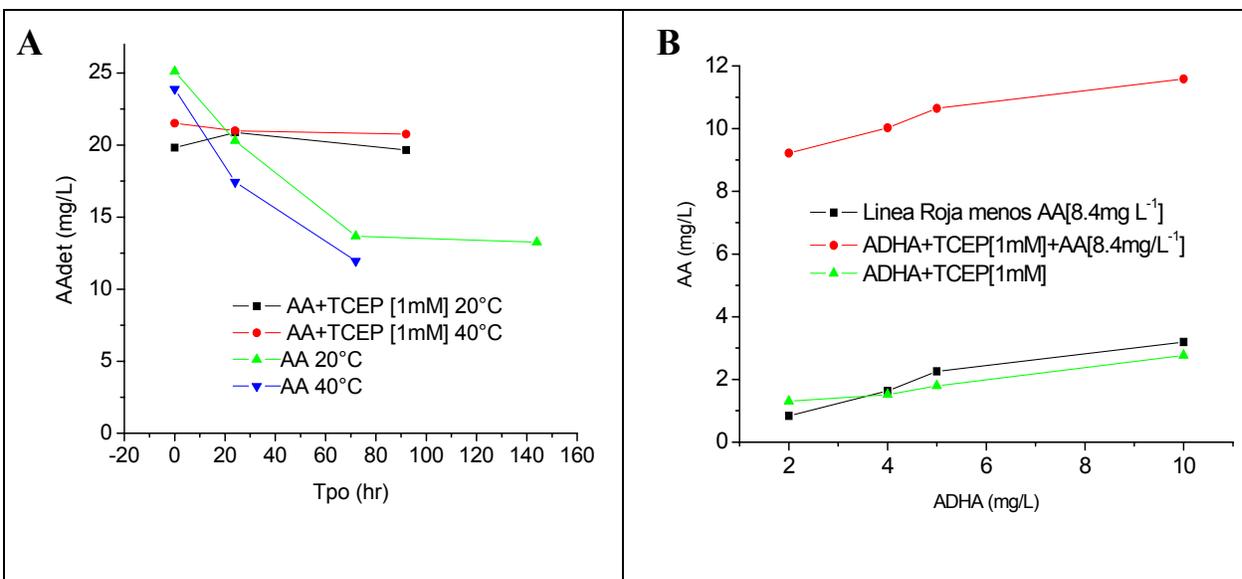


**Figura 9:** Análisis por ECZ de la conversión de ADHA [20mg/L] a AA con TCEP a diferentes concentraciones con temperaturas de 20 y 40 °C

Con el fin de probar las condiciones óptimas de reducción del ADHA con TCEP se hicieron diferentes ensayos, analizados por ECZ y Espectrofotometría UV-Vis. Primero se probó si había reducción del ADHA [20mg/L] en el tiempo trabajando con bajas concentraciones de TCEP (0,7; 0,9 y 1 mM) a 20 y 40° C (Figura 8). Se observó que efectivamente había reducción y que la mayor reducción ocurrió a las 24 hrs. a 40° C con TCEP [1mM], por otro lado se analizó la estabilidad del AA a estas temperaturas y se observó que es bastante inestable para una temperatura de reacción de 40° C (Figura 8). De igual forma se probó por ECZ variando solo las concentraciones de TCEP siendo estas 0,5; 1 y 4 mM, encontrándose que la mayor reducción ocurrió a las 72 hrs. a 40°C con TCEP [1mM] (Figura 9). Si bien hubo diferencias en ambos resultados, se optó por el período de 24 hrs. de reacción con TCEP [1mM] ya que había una buena reducción de ADHA y que usar una temperatura de reacción de 40° C provocaría una rápida oxidación del AA presente en la muestra, debido a esto las condiciones de reducción de ADHA en AA se establecieron como las siguientes: Concentración TCEP [1 mM] con un tiempo de reacción de 24 hrs. a 20° C.

Se evaluó también la capacidad del TCEP de evitar la oxidación del AA [20mg/L] a través del tiempo, a temperatura de 20 y 40° C, observándose una disminución de la

oxidación de AA respecto al AA sin TCEP a ambas temperaturas (Figura 10A). También se evaluó la interferencia del contenido inicial de AA en la muestra sobre la reducción del ADHA. Para ello se determinó primero la cantidad reducida de ADHA por el TCEP y después sobre esa muestra se agregó una cantidad conocida de AA siendo analizada nuevamente, después del análisis se le restó a la cantidad de AA encontrada, el AA agregado, determinándose que no hubo un marcado efecto sobre la reducción de ADHA (Figura 10B).



**Figura 10:** Estabilidad del AA determinada por ECZ en ausencia y presencia de TCEP a 20 y 40° C (A) y evaluación de la interferencia del AA en la muestra, sobre la reducción del ADHA con TCEP (B).

En base al método optimizado de análisis para el AA se estableció una curva de calibración usando 2 y 5 % p/p de MPA como se muestra en la Tabla 1 junto a sus respectivos límites de detección y en un rango de concentración de 1 a 5 mg/L con MPA 2% y de 2 a 7 mg/L con MPA 5%

**Tabla 1:** Curvas de calibración para AA en MPA 2 y 5% p/p

Analito	[MPA] (%)	n	Curva de Calibración	Coefficiente de Regresión (r)	Error Estándar (área)	Límite de Detección (μmol/L)
AA	2	4	Y= 907,5*X-637,9	0,9995	62,3	1,17
	5	5	Y= 2.411,1*X-2.592,5	0,9983	314	2,21

Además se probó la repetibilidad y reproducibilidad del método, datos mostrados en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Repetibilidad y reproducibilidad del método para analizar AA en MPA 2 y 5% p/p

<b>Repetibilidad</b>				
	MPA 2 %		MPA 5%	
Repetición	Concentración Encontrada (mg/L)	Tiempo (min)	Concentración encontrada (mg/L)	Tiempo (min)
1	4,01	5,08	3,48	5,35
2	3,94	5,08	3,36	5,35
3	4,04	5,08	3,15	5,37
Promedio	4,00		3,33	
D.E.	0,05		0,16	
C.V.(%)	<b>1,21</b>		<b>4,91</b>	

<b>Reproducibilidad</b>				
	MPA 2 %		MPA 5%	
Día	Concentración encontrada (mg/L)	Tiempo (min)	Concentración encontrada (mg/L)	Tiempo (min)
1	3,07	5,25	4,47	5,00
2	3,18	5,15	4,46	5,03
3	3,02	5,27	4,32	4,98
Promedio	3,09		4,42	
D.E.	0,08		0,08	
C.V.(%)	<b>2,63</b>		<b>1,81</b>	

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

Junto con esto se probó el porcentaje de recuperación del AA en MPA 2 y 5 % como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Porcentaje de recuperación para AA en MPA 2 y 5% p/p

MPA 2%				
Repetición	Concentración Inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración Esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración Obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	1,01	5,81	4,89	84,1
2	0,26	5,06	4,29	84,7
3	0,81	5,61	5,58	99,6
Promedio				<b>89,5</b>
D.E				<b>8,73</b>
C.V%				<b>9,76</b>
MPA 5 %				
Repetición	Concentración Inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración Esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración Obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	1,10	2,58	2,50	97,1
2	0,89	2,37	2,60	110
3	0,74	2,22	2,68	121
Promedio				<b>109</b>
D.E				<b>11,9</b>
C.V%				<b>10,9</b>

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

#### 4.3 Optimización del método para la determinación de GSH y GSSH

Tomando como base el método optimizado previamente (González 2005) se ajustaron algunas condiciones y se estableció la curva de calibración, rango lineal y límite de detección para GSH y GSSG en la matriz 2 y 5 % p/p en MPA y en un rango de concentración de 2,5 a 50  $\mu\text{M}$  con MPA 2% y de 5 a 30  $\mu\text{M}$  con MPA 5%. (Tabla 4).

**Tabla 4:** Curvas de calibración para GSH y GSSG en MPA 2 y 5% p/p

Analito	[MPA] (%)	Curva de Calibración	n	Coefficiente de Regresión (r)	Error Estándar (área)	Límite de Detección ( $\mu\text{mol/L}$ )
GSH	2	Y= 580*X-309	7	0,9994	410,9	2,13
	5	Y= 634*X-1039	5	0,9936	799,1	3,78
GSSG	2	Y= 1501*X-382	7	0,9998	499,3	0,10
	5	Y= 1292*X+1780	5	0,9992	578,1	1,34

La repetibilidad y reproducibilidad del método para GSH y GSSG se presenta en las Tablas 5 y 6

**Tabla 5:** Repetibilidad para GSH y GSSG en MPA 2 y 5% p/p

<b>Repetibilidad</b>				
MPA 2%				
	GSH		GSSG	
Repetición	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)
1	10,9	3,90	10,4	4,30
2	10,6	3,93	10,6	4,30
3	10,4	3,92	10,3	4,30
Promedio	10,7		10,4	
D.E.	0,27		0,16	
C.V.(%)	<b>2,50</b>		<b>1,52</b>	
MPA 5%				
	GSH		GSSG	
Repetición	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)
1	15,5	3,90	15,3	4,30
2	14,4	3,90	15,4	4,40
3	15,3	3,80	15,4	4,30
Promedio	15,1		15,4	
D.E.	0,56		0,07	
C.V.(%)	<b>3,73</b>		<b>0,48</b>	

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

**Tabla 6:** Reproducibilidad para GSH y GSSG en MPA 2 y 5% p/p

<b>Reproducibilidad</b>				
MPA 2%				
	GSH		GSSG	
Día	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)
1	10,9	3,90	10,4	4,30
2	10,1	3,70	11,0	4,00
3	9,08	3,90	10,9	4,30
Promedio	10,0		10,8	
D.E.	0,94		0,34	
C.V.(%)	<b>9,31</b>		<b>3,16</b>	
MPA 5%				
	GSH		GSSG	
Día	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tiempo (min)
1	11,8	3,90	14,9	4,37
2	13,2	3,91	14,0	4,40
3	10,3	3,88	13,3	4,35
Promedio	11,8		14,1	
D.E.	1,46		0,78	
C.V.(%)	<b>12,4</b>		<b>5,53</b>	

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

Además se estableció la recuperación del método para GSH y GSSG en MPA 2 y 5% p/p, datos mostrados en las Tablas 7 y 8.

**Tabla 7:** Porcentaje de recuperación para GSH y GSSG en MPA 2% p/p

<b>GSH</b>				
Repetición	Concentración inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	1,93	24,6	16,8	68,4
2	2,16	24,9	22,8	91,7
3	4,70	27,4	20,9	76,3
Promedio				<b>78,8</b>
D.E				<b>11,8</b>
C.V%				<b>15,0</b>
<b>GSSG</b>				
Repetición	Concentración inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	6,70	29,4	21,5	73,0
2	7,90	30,6	33,6	110
3	6,78	29,5	31,9	108
Promedio				<b>97,0</b>
D.E				<b>20,8</b>
C.V%				<b>21,4</b>

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

**Tabla 8:** Porcentaje de recuperación para GSH y GSSG en MPA 5% p/p

<b>GSH</b>				
Repetición	Concentración inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	3,21	13,4	10,6	79,1
2	2,89	13,1	10,9	83,5
3	2,09	12,3	9,16	74,5
Promedio				<b>79,0</b>
D.E				<b>4,47</b>
C.V%				<b>5,65</b>
<b>GSSG</b>				
Repetición	Concentración inicial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración esperada ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración obtenida ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperación (%)
1	7,67	17,9	15,4	86,1
2	5,47	15,7	14,8	94,7
3	6,55	16,8	15,1	90,0
Promedio				<b>90,3</b>
D.E				<b>4,28</b>
C.V%				<b>4,74</b>

D.E.: Desviación Estándar, C.V.: Coeficiente de Variación

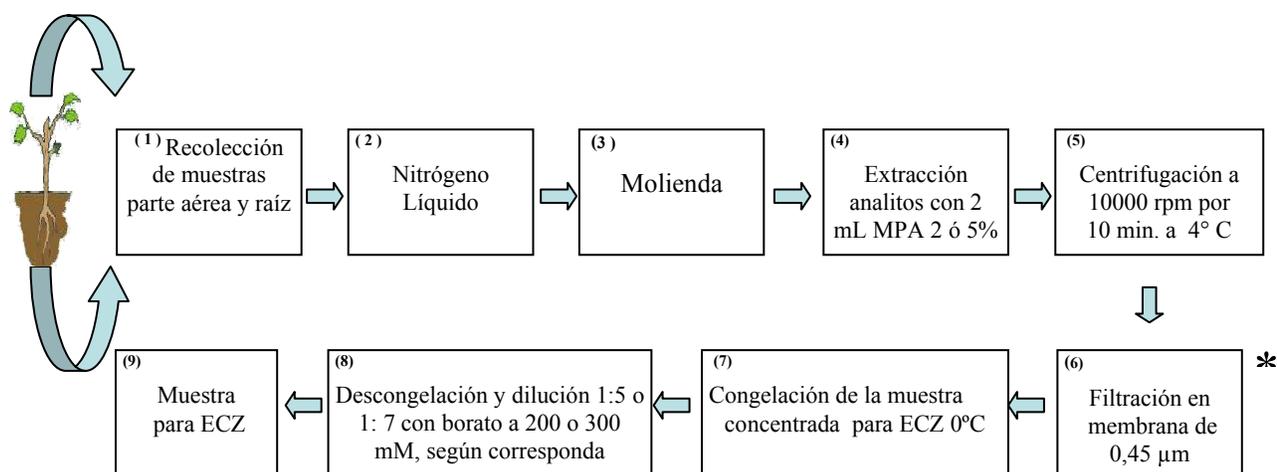
En los parámetros sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad del análisis de GSH, GSSG y AA los mejores resultados se obtuvieron con el método en que se extrajo con MPA al 2%. La extracción con MPA al 5% fue mejor solo en la recuperación de GSH y GSSG.

#### 4.4 Protocolo de tratamiento de las muestras para su análisis

Se preparó un procedimiento general para el tratamiento de las muestras de 2 experimentos de cultivo hidropónico. Los tratamientos diferían en los metales usados, su concentración y el tipo de materia orgánica usada, estos datos se resumen en la Tabla 9. Si bien las muestras de ambos experimentos fueron tratadas bajo el mismo protocolo estas diferían en la concentración de MPA usada.

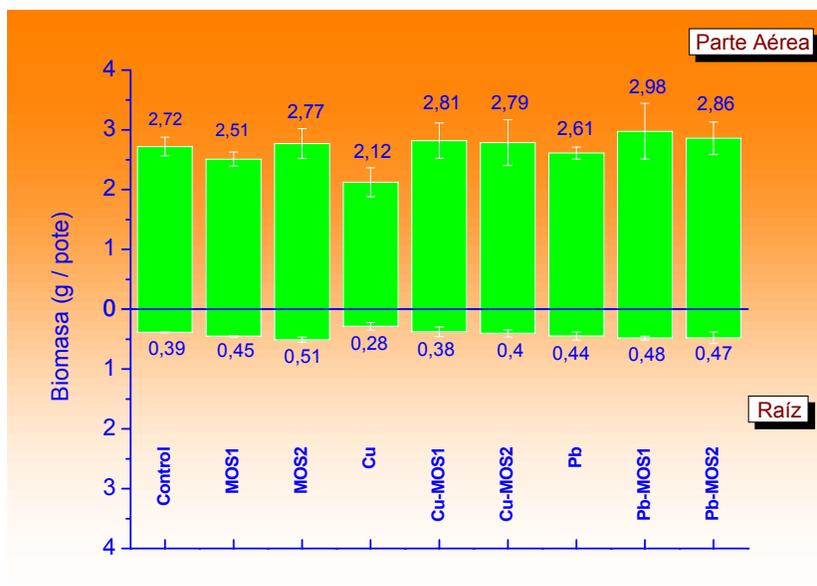
**Tabla 9:** Algunas características de los experimentos con planta.

Metales	Experimento 1		Experimento 2		
	Cu	Pb	Cu	Cd	Ni
Concentración de metales en la solución nutritiva ( $\mu\text{M}$ )	50	50	50	4	50
Materia orgánica usada	Soluble		Soluble y Coloidal		
Origen de Materia orgánica	El Trebal y Vallenar		El Trebal		
Concentración de MPA usada en la extracción (% p/p)	2		5		
Tiempo de aplicación (h)	48	48	48	48	48

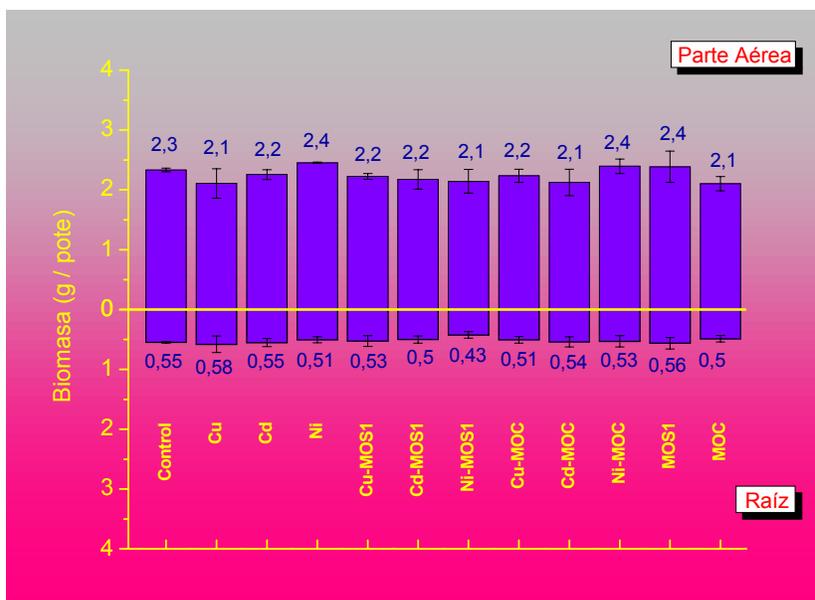
**Figura 11:** Protocolo para la extracción de las muestras (\*): Para la extracción con MPA al 2% el paso (6) se efectuó después del (7), previa descongelación de la muestra concentrada

#### 4.5 Rendimiento del material vegetal

Los distintos tratamientos aplicados por 48 h. No produjeron cambio significativos en la biomasa de la parte aérea (Figura 12 y Tabla 1 anexos), exceptuando el tratamiento con Cu donde se observó una leve disminución ( $t = 3,56$ ;  $P = 0,02$ ) con respecto al control. En cuanto a la raíz también se observó una disminución de la biomasa con Cu, además se observaron aumentos significativos en la biomasa para los tratamientos MOS1 ( $t = -8,229$ ,  $P < 0,01$ ), MOS2 ( $t = -4,606$ ,  $P < 0,01$ ) y PbMOS1 ( $t = -5,020$ ,  $P < 0,01$ ) en la raíz respecto al control.



**Figura 12:** Biomasa en peso seco (g/pote), parte aérea y raíz para el Experimento 1



**Figura 13:** Biomasa en peso seco (g/pote) parte aérea y raíz para el Experimento 2

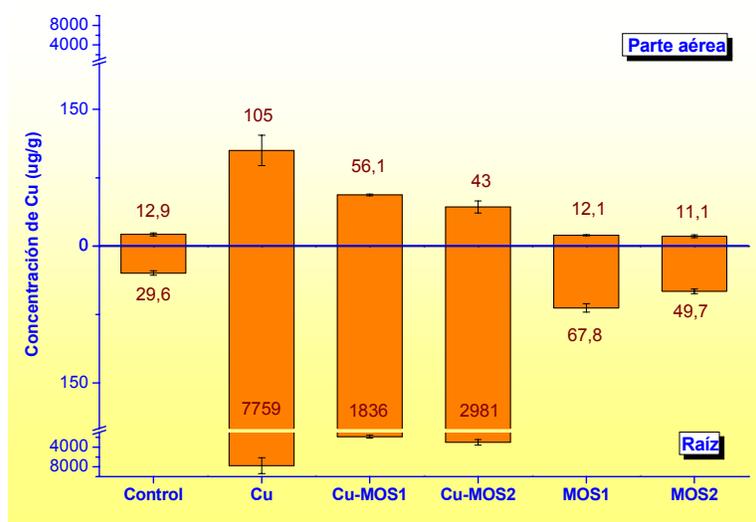
Con respecto al experimento 2 (Figura 13 y Tabla 2 anexos) solo se observa un aumento significativo con respecto al control en la parte foliar para el tratamiento con Níquel ( $t = -6,61693$ ,  $P < 0,01$ ) en la raíz en cambio, no se observan diferencias significativas.

## 4.6 Absorción de metales y macronutrientes

### 4.6.1 Cobre

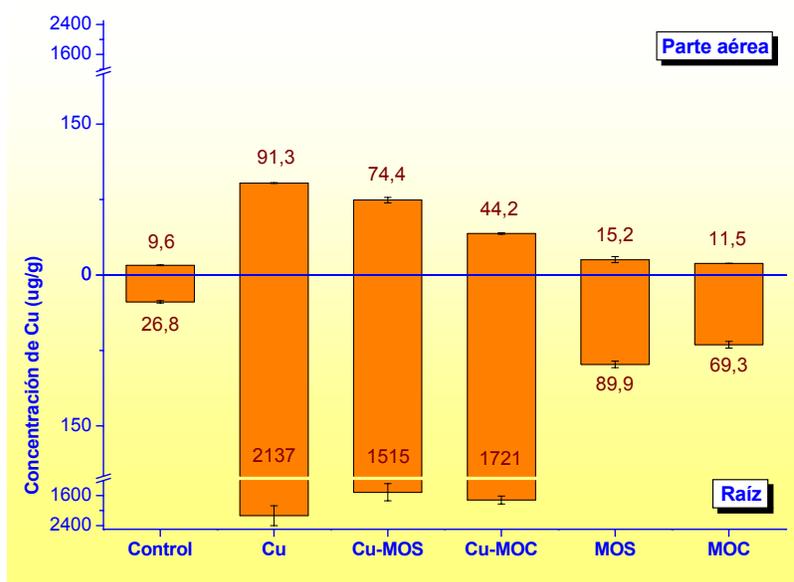
El cobre es un metal esencial para la planta y posee funciones bioquímicas tales como: (i) formar parte de enzimas y proteínas, (ii) controla la producción de DNA y RNA ya que durante un déficit en Cu se inhibe la producción, (iii) además de jugar otros roles muy importantes participando en la fotosíntesis, respiración, distribución de carbohidratos, etc.

Los rangos normales que se han encontrado en la parte aérea de distintas plantas creciendo en variadas condiciones, no exceden los 20  $\mu\text{g/g}$  (Peso seco), cuando la concentración de cobre sobrepasa los límites normales para las plantas se convierte en un metal tóxico y se anulan los mecanismos de absorción de la planta, comenzando a absorber el Cu de forma pasiva es decir siendo solo controlado por gradientes de concentración y difusión. (Kabata-Pendias 2001). En este estudio se usó una concentración fitotóxica de 50 $\mu\text{M}$  de cobre.



**Figura 14:** Cobre en plantas ( $\mu\text{g/g}$ ) en parte aérea y raíz para el experimento 1

En cuanto a la absorción de cobre para el primer experimento (Figura 14 y Tabla 3 anexos) se observó que los tratamientos con cobre tienen cantidades muy superiores a los demás, el tratamiento con cobre libre presenta un aumento de más de 8 y 262 veces en la parte aérea y raíz, respectivamente, que lo encontrado en el control, dentro de los tratamientos sin adición de cobre (MOS1 y MOS2) se observó que para la parte aérea no hubo mayor diferencia con el control, en cuanto a la raíz el cobre aumentó en especial para MOS1 donde aumentó más del doble, respecto al control. Por otro lado para los tratamientos con Cu-MOS hay notorias diferencias respecto al tratamiento con cobre libre, tanto para la parte aérea como raíz, ya que para la parte aérea se tiene cerca de la mitad y en la raíz menos de la mitad con relación a lo encontrado en el tratamiento con cobre libre.

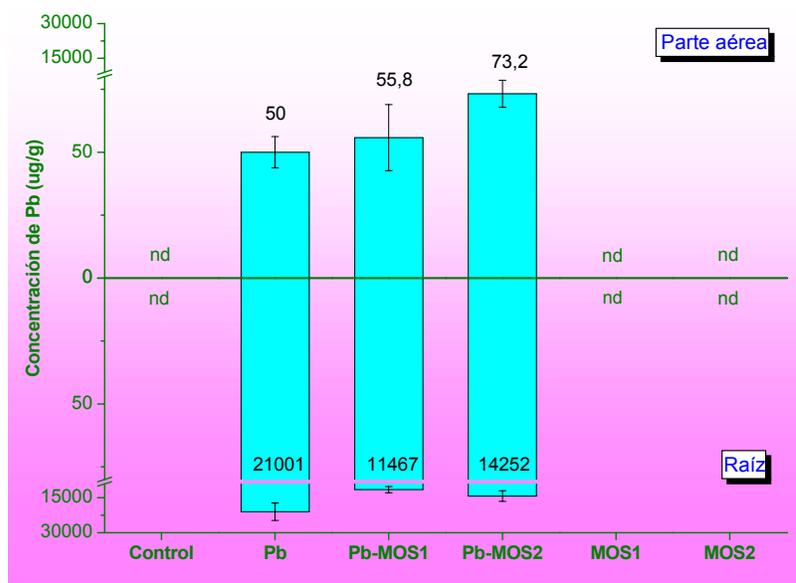


**Figura 15:** Cobre en plantas ( $\mu\text{g/g}$ ) en parte aérea y raíz para el experimento 2

En el caso del segundo experimento (Figura 15 y Tabla 4 anexos) la tendencia observada en el primer experimento se repite, no obstante varían las concentraciones alcanzadas siendo éstas menores, en los tratamientos con cobre, en especial en la raíz y levemente mayores en los tratamientos sin cobre (MOS y MOC) tanto en la parte aérea como raíz.

#### 4.6.2 Plomo

Aun cuando el plomo se encuentra naturalmente en todas las plantas en pequeña cantidad no se ha demostrado que cumpla un rol metabólico en ellas, su concentración en plantas cultivadas en suelos no contaminados ni mineralizados esta en el rango de los 0,1 a 10  $\mu\text{g/g}$  (peso seco). El plomo es tomado pasivamente por las plantas y por lo tanto si el plomo está en solución la cantidad y velocidad con la que se absorbe es proporcional a su concentración. (Kabata-Pendias 2001) No obstante, se trasporta poco plomo desde la raíz a las hojas (menos del 3 %) donde diferentes tejidos de la raíz actúan como barreras para el transporte de plomo al apoplasto y simplasto (Verma y Dubey 2003) por lo que se acumula principalmente en las raíces.

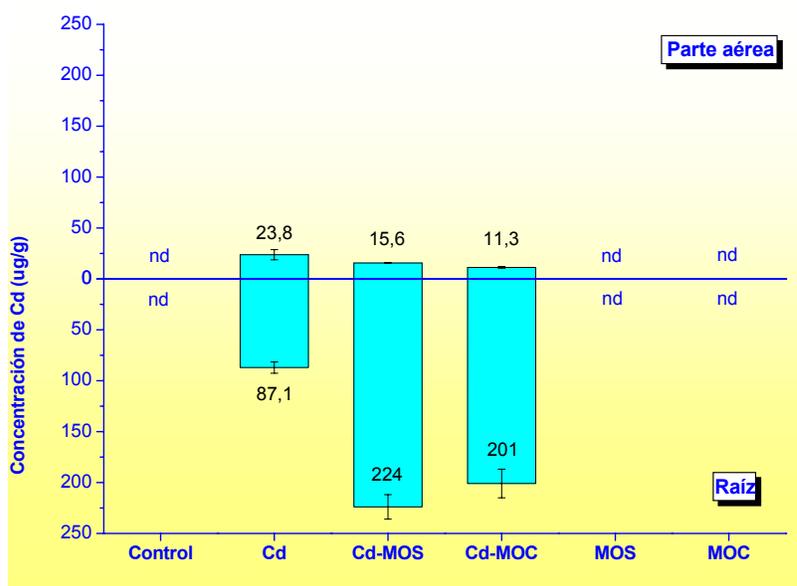


**Figura 16:** Plomo en plantas ( $\mu\text{g/g}$ ) en parte aérea y raíz para el experimento 1

Considerando que se trata de un cultivo hidropónico, donde la composición del medio esta controlada, fue previsible la presencia del metal solo en plantas a las cuales se les aplicó plomo (Figura 16 y Tabla 3 anexos). Se apreció una gran diferencia entre las cantidades encontradas en raíces y parte foliar demostrando la poca translocación del plomo hacia la parte foliar. Por otro lado, se observa un notable efecto negativo en la acumulación de plomo para los tratamientos con MOS.

### 4.6.3 Cadmio

El cadmio es considerado un elemento no esencial para los procesos metabólicos de la planta, pero es de igual forma absorbido raíces y translocado a las hojas (Kabata-Pendias2001), además según (Alloway 1992) el cadmio pertenece al grupo de metales que sufren mayor translocación por parte de la planta.



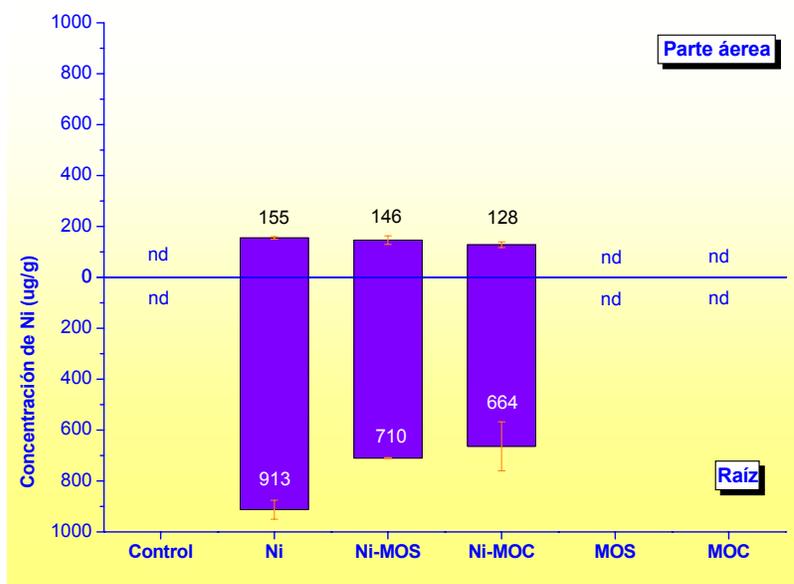
**Figura 17:** Cadmio ( $\mu\text{g/g}$ ) en parte aérea y raíz en plantas del experimento 2

Al ser un metal no esencial solo se encontró en los tratamientos que incluían este metal. Se observó una importante translocación a la parte aérea y acumulación en raíces, destacando la diferencia de concentración de los tratamientos con MOS respecto a los con metal libre (Figura 17 y Tabla 4 anexos).

### 4.6.4 Níquel

Al igual que el cadmio no hay evidencia de que el níquel cumpla un rol metabólico en la planta, aunque se han reportado efectos beneficiosos en el crecimiento de esta, en las

plantas su concentración varía considerablemente, en plantas de tomate se ha encontrado que tienen entre un 0,43 y 0,48  $\mu\text{g/g}$  (peso seco). El níquel en solución es tomado rápidamente por la planta y está positivamente correlacionado con su concentración y aunque su transporte y acumulación parece estar regulado metabólicamente es bastante móvil y puede ser acumulado en raíces y plantas (Kabata-Pendias 2001).



**Figura 18:** Níquel ( $\mu\text{g/g}$ ) en parte aérea y raíz en plantas del experimento 2

Al igual que en los otros metales no esenciales el níquel se encontró solo en los tratamientos con este metal observándose una mayor acumulación en raíces (Figura 18 y Tabla 4 anexos). Tanto para la parte aérea como raíz se observa una disminución en la cantidad encontrada en los tratamientos con MOS, respecto del tratamiento con níquel.

## 4.6.5 Macronutrientes

Tabla 11: Concentración de macronutrientes en hojas y raíz de tomate para Experimento 1

	Tratamiento	Ca (mg/g)*	D.E	Mg (mg/g)	D.E	P (mg/g)	D.E	K (mg/g)	D.E
Parte Aérea	Control	32,4	1,6	4,80	0,4	3,00	0,1	68,2	3,1
	MOS1	28,3	0,2	4,50	0,2	2,60	0,1	64,2	3,3
	MOS2	29,2	1,1	4,30	0,3	2,30	0,2	61,1	5,3
	Cu	27,4	0,9	4,20	0,2	2,70	0,2	70,0	6,7
	Cu-MOS1	28,5	1,5	4,30	0,4	2,40	0,2	59,6	6,5
	Cu-MOS2	29,3	3	3,80	0,2	2,30	0,2	63,8	6,5
	Pb	30,7	0,8	5,00	0,4	2,50	0,3	63,7	0,1
	Pb-MOS1	27,3	0,2	4,20	<0,1	2,30	0,2	89,1	7,6
	Pb-MOS2	28,2	2,1	4,10	0,4	2,10	0,2	84,3	4,5
	Raíz	Control	10,8	1,5	6,40	0,3	2,40	0,5	29,0
MOS1		10,5	0,7	4,80	0,2	2,80	0,1	44,1	5,1
MOS2		9,90	0,5	6,70	0,9	2,50	0,2	27,9	3,4
Cu		8,80	0,3	3,90	0,2	2,10	0,2	23,9	0,9
Cu-MOS1		11,1	0,9	4,00	0,2	2,40	0,2	29,8	2,9
Cu-MOS2		12,4	0,9	3,70	0,2	2,40	0,2	24,4	3,5
Pb		7,40	0,2	5,20	0,5	2,70	0,1	37,5	2,5
Pb-MOS1		7,60	0,9	4,90	0,3	2,90	0,2	34,0	3,7
Pb-MOS2		9,40	0,7	5,10	0,1	2,90	0,2	30,9	2,1

\* Valores promedio (n = 4), D.E. = Desviación Estándar

**Tabla 12:** Concentración de macronutrientes en hojas y raíz de tomate para **Experimento 2**

	Tratamiento	Ca (mg/g)*	D.E	Mg (mg/g)	D.E	P (mg/g)	D.E	K (mg/g)	D.E
<b>Parte Aérea</b>	<b>Control</b>	29,4	0,2	3,9	0,1	2,19	0,13	59,9	6,0
	<b>Cu</b>	27,3	1,8	3,6	0,6	2,00	0,12	50,3	2,6
	<b>Cd</b>	31,2	3,4	3,7	0,2	2,26	0,02	60,8	3,1
	<b>Ni</b>	27,5	0,4	4,1	0,6	2,28	0,23	65,6	4,1
	<b>Cu-MOS1</b>	23,2	0,1	3,2	0,1	2,07	0,18	61,0	5,2
	<b>Cd-MOS1</b>	23,9	0,4	3,3	0,1	1,93	0,03	51,1	3,5
	<b>Ni-MOS1</b>	22,8	1,3	3,2	0,1	2,04	0,16	51,3	4,2
	<b>Cu-MOC</b>	24,1	1,4	3,1	0,2	1,84	0,10	44,5	3,4
	<b>Cd-MOC</b>	23,2	0,9	3,6	0,2	1,95	0,25	58,3	4,9
	<b>Ni-MOC</b>	23,3	1,4	3,0	0,2	1,91	0,13	44,6	3,0
	<b>MOS1</b>	23,4	1,5	3,3	0,2	1,83	0,22	43,9	1,5
	<b>MOC</b>	24,3	1,5	3,2	0,2	2,06	0,14	47,7	4,2
<b>Raíz</b>	<b>Control</b>	11,3	2,2	5,0	1,0	2,97	0,24	41,9	6,8
	<b>Cu</b>	11,3	0,2	3,4	0,1	2,60	0,16	33,7	3,8
	<b>Cd</b>	10,3	1,2	4,0	0,7	2,59	0,33	44,9	3,2
	<b>Ni</b>	7,50	1,2	5,7	0,5	2,67	0,63	45,1	3,7
	<b>Cu-MOS1</b>	7,90	0,1	4,6	0,9	3,05	0,20	33,5	3,1
	<b>Cd-MOS1</b>	6,60	1,1	5,5	1,0	2,86	0,09	37,8	2,7
	<b>Ni-MOS1</b>	6,10	1,6	6,0	0,7	3,16	0,11	42,3	2,0
	<b>Cu-MOC</b>	8,40	0,9	5,7	0,5	2,83	0,24	30,4	1,5
	<b>Cd-MOC</b>	6,60	1,0	4,6	0,5	2,81	0,42	37,2	2,3
	<b>Ni-MOC</b>	6,60	1,7	3,5	0,2	2,93	0,35	40,8	2,9
	<b>MOS1</b>	5,50	0,3	3,5	0,2	2,71	0,11	33,4	2,8
	<b>MOC</b>	6,10	0,3	3,8	0,4	2,86	0,05	35,9	3,7

\* Valores promedio (n = 4), D.E. = Desviación Estándar

El calcio es un constituyente de la pared celular, requerido como cofactor en algunas enzimas involucradas en la hidrólisis de ATP y fosfolípidos además de actuar como mensajero secundario para variadas respuestas tanto medioambientales como hormonales.

En el experimento 2 se observó una tendencia que indica menos concentración de calcio en parte aérea y raíz de aquellos tratamientos que incorporan MOS y MOC (Tabla 12). Esta tendencia no fue observada en el experimento 1 para la raíz pero si para la parte aérea (Tabla 11).

El fósforo es componente de ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, fosfolípidos y juega un rol clave en las reacciones con ATP, además de ser intermediario de la respiración y fotosíntesis.

Se observó menos concentración de fósforo en la parte aérea del experimento 1 respecto del control (Tabla 11), diferencia que fue más marcada para los tratamientos con MOS. No se observó esta tendencia ni en la parte aérea, ni en la raíz del experimento 2.

En cuanto al magnesio este es requerido por muchas enzimas involucradas en la transferencia de fosfato, también es constituyente de la clorofila. Como ión el magnesio tiene un rol específico en la activación de enzimas involucradas en la respiración, fotosíntesis y síntesis de DNA y RNA.

En los datos mostrados para el experimento 1 (Tabla 11) se nota una disminución de la cantidad encontrada en la raíz para todos los tratamientos excepto MOS2 con cobre. En el experimento 2 no se observó una tendencia clara. En las hojas para ambos experimentos la tendencia es a tener menos magnesio que el control (Tabla 12).

Respecto al potasio este es requerido como cofactor por más de 40 enzimas, entre ellas algunas involucradas en la respiración y fotosíntesis, además es el catión principal en el establecimiento de la turgencia celular así como en la mantención de la electroneutralidad.

Se observaron pequeñas diferencias en las cantidades de potasio encontradas en las hojas del primer experimento, excepto para Pb-MOS1 y Pb-MOS2 donde hubo un aumento importante en la concentración de potasio, en la raíz el potasio aumentó levemente en MOS1 y Pb, además de Pb-MOS1 y Pb-MOS2.

En el experimento 2 los tratamientos con MOC tendieron a disminuir la cantidad de potasio encontrado en la parte aérea y raíz, este efecto fue menos notorio en los tratamientos con Ni-MOC y Cd-MOC, probablemente debido a la acción propia de estos metales, ya que en los tratamientos con Ni y Cd libres aumento el potasio.

#### 4.7 Efecto de MOS y MOC sobre niveles de metal y nutrientes en la planta.

Al comparar la absorción de cobre por parte de la planta con la absorción del metal cuando se aplicó junto a MOS, se observó un efecto significativo en la mayoría de los metales (Figuras 14-18 y Tablas 3 y 4 anexos).

Para el primer experimento tanto la MOS1 como la MOS2 ayudaron a disminuir la cantidad de cobre absorbido por la planta en especial en la raíz donde se encontró un 76% y 62% menos, respectivamente, que la concentración encontrada cuando se aplicó metal sin MOS. De igual modo se encontró un 46% y 59% menos en la parte aérea. Los datos encontrados se contradicen en parte con un estudio de Ashworth y Alloway (2007) donde observó que al tratar la planta de cebada (*Hordeum vulgare* L. cv Tyne) con Cu libre y Cu-MOS, esta no presentaba una diferencia significativa en la cantidad de Cu encontrado para ambos tratamientos, sin embargo en el tratamiento Cu-MOS encontraron que tenía significativamente la misma biomasa que la planta control. No así la planta con Cu libre que presentaba menor biomasa, concluyendo que el Cobre en el tratamiento con MOS estaba en una forma menos tóxica. Esta última observación sobre la biomasa también se observó en este estudio de forma más clara en el experimento 1, aunque el tratamiento con metal duró solo 48 hrs.

En el mismo sentido para el segundo experimento también se observó una disminución en la concentración de cobre, para la raíz en un 29% y 19% para MOS1 y MOC, respectivamente y un 22% y 57% para MOS1 y MOC en hojas, respectivamente (Figuras 14,15 y Tablas 3 y 4 anexos)

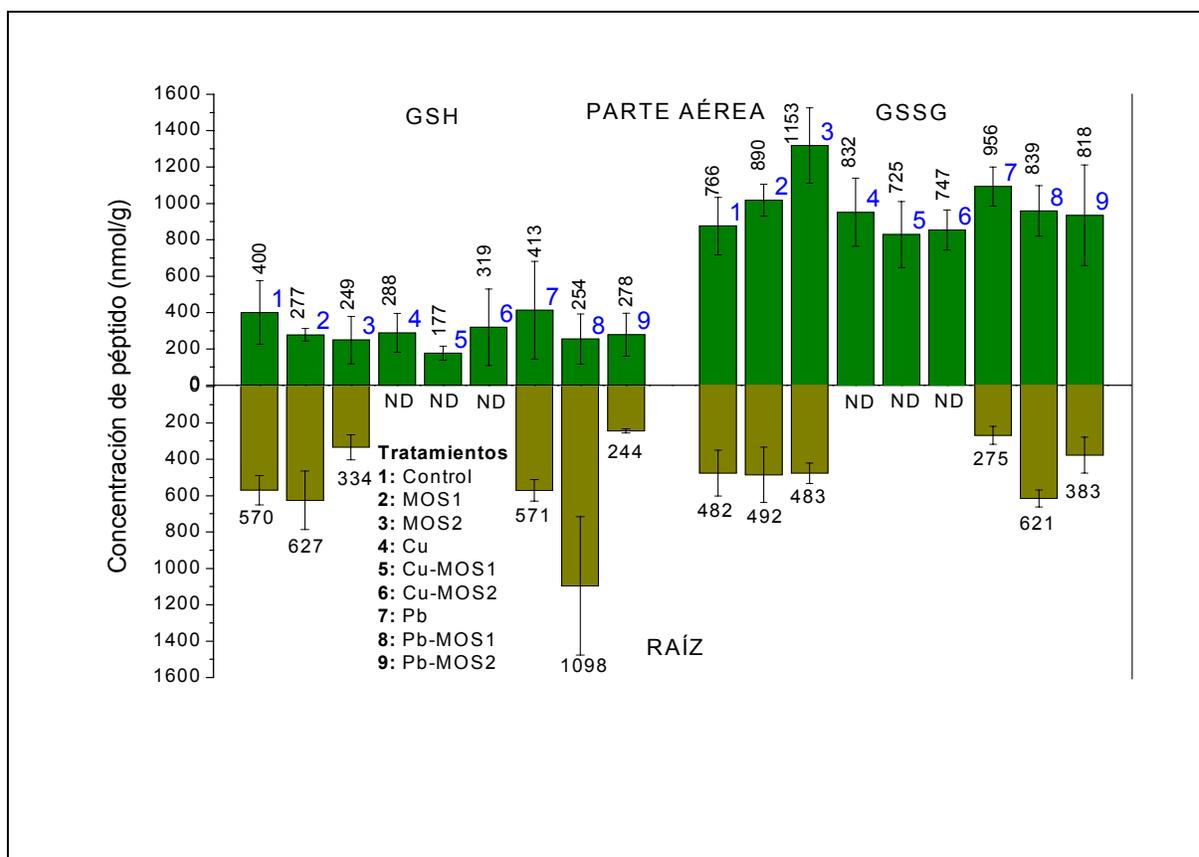
En el caso del Plomo para el primer experimento tanto la MOS1 como la MOS2 disminuyeron la concentración de Plomo en la raíz en un 45% y 32% respectivamente, pero en el caso de las hojas se observó un leve aumento de 12% con MOS1 y un aumento mayor de un 46% con MOS2 respecto del tratamiento con Pb libre, sin embargo el porcentaje de plomo translocado de mantuvo (Figura 16, Tabla 3 anexos).

Para el Cadmio hubo un significativo aumento en la raíz de un 157% y 131% para MOS1 y MOC y en la parte foliar hubo una disminución de Cd en un 34% y 52% para MOS1 y MOC, respectivamente, respecto del tratamiento con Cd libre, lo que puede deberse a una menor translocación debido a la mayor acumulación en la raíz (Figura 17, Tabla 4 anexos).

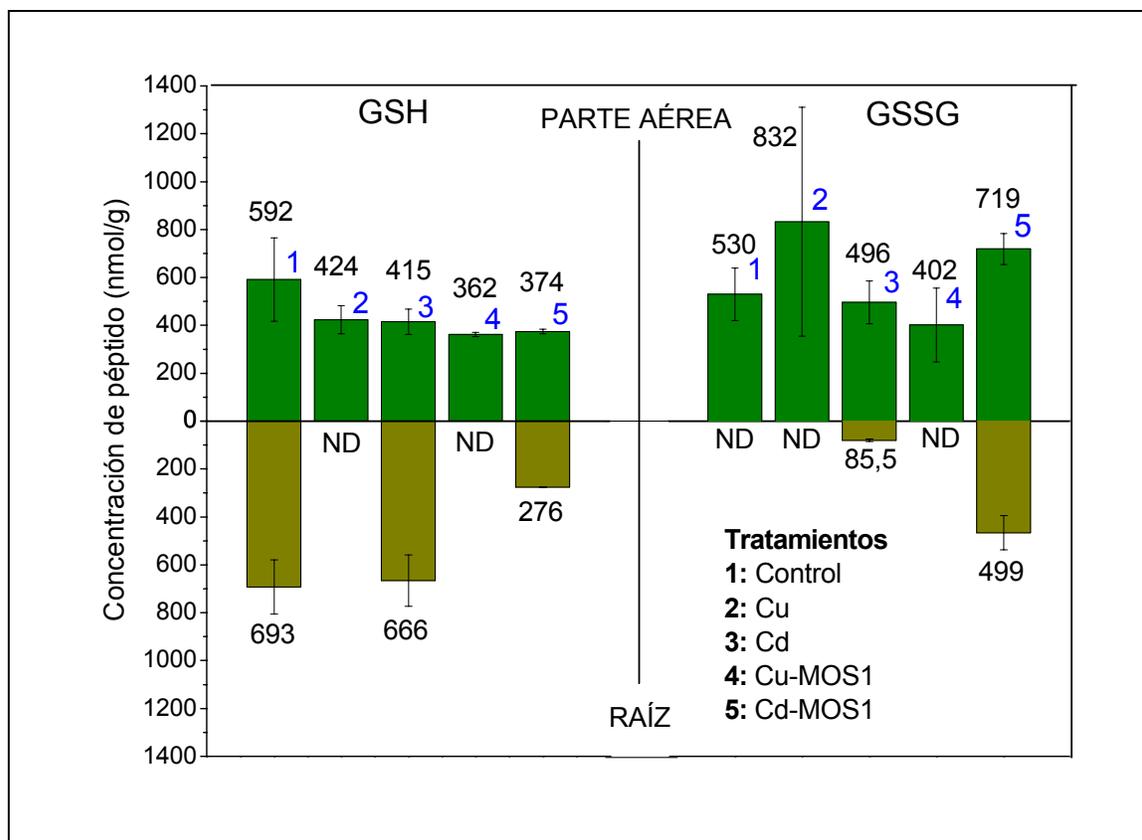
En cuanto al Níquel en el segundo experimento se observó una menor concentración en la raíz cuando esta junto a MOS 1 y MOC con una disminución del 22% y 27%, respectivamente, respecto del tratamiento con Ni libre, en la parte foliar no hubo una disminución muy importante en la concentración de níquel, la mayor disminución fue de un 17% para MOC (Figura 18, Tabla 4 anexos).

Respecto de los macronutrientes estos siempre disminuyen de forma leve en la parte aérea para los tratamientos con MOS y MOC, este efecto se repite en la parte raíz con algunas excepciones en el primer experimento como: el fósforo con MOS1 y MOS2, el magnesio con MOS2 y el potasio con MOS1 en los cuales aumentó la cantidad de estos macronutrientes.

#### 4.8 Efecto de los metales sobre niveles de GSH/GSSG y AA/ADHA



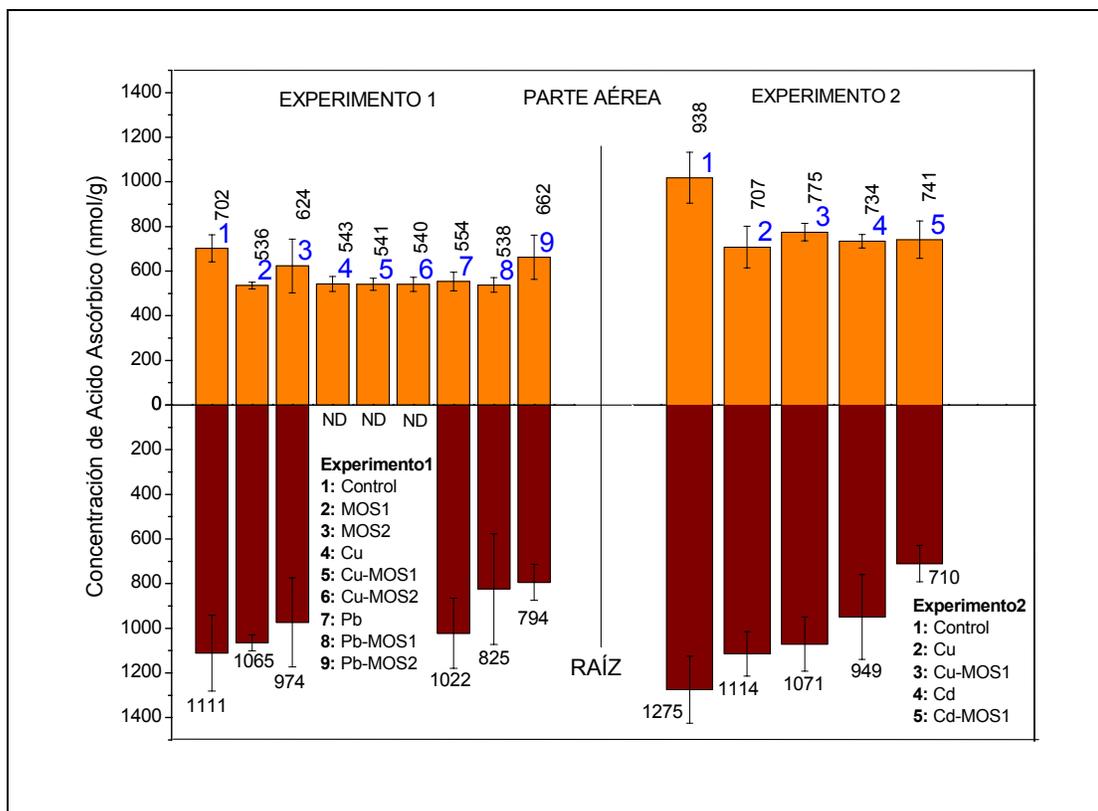
**Figura 19:** GSH y GSSG (nmol/g) en parte aérea y raíz para el experimento 1



**Figura 20:** GSH y GSSG (nmol/g) en parte aérea y raíz para el experimento 2

Con respecto al cobre tanto para el primer como segundo experimento se observan los mismos patrones que son una disminución en GSH en la parte foliar en cerca de un 28% y una disminución del GSH y GSSG en la raíz hasta el punto de ser indetectable por el método usado en este estudio (Figuras 19 y 20, Tablas 5,6 y 7 anexos). La disminución en la concentración de GSH y el aumento de GSSG en la parte foliar observada con cobre se podría deber a que el cobre reduce la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) (Smith et al.1989), hecho demostrado en un estudio con la misma concentración de cobre usada en este trabajo donde la disminución de la actividad de la GR fue de 44% (Nagalakshmi y Prasad 2001) por lo que el GSSG no estaría siendo reducido por esta enzima de igual forma que en el control. Adicionalmente, el GSH según (Freedman y col. 1989) es capaz de reducir el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  el cual forma fácilmente complejos con el GSH. Esto podría explicar lo observado en la raíz ya que debido a la gran acumulación de cobre en relación a la parte aérea, estos sistemas de defensa serian sobrepasados, viéndose muy disminuida la

capacidad tanto de producir como de reciclar GSH, lo que explicaría la imposibilidad de detectar el GSH o GSSG en la raíz.



**Figura 21:** AA (nmol/g) de parte aérea y raíz para el experimento 1 y experimento 2

En cuanto a los niveles de AA, la disminución de su concentración en la parte aérea para ambos experimentos en plantas tratadas con cobre se podría deber a la mayor cantidad de ERO producidas por el cobre directamente catalizando la producción de éstas por medio de la reacción de Fenton e indirectamente a través del daño al fotosistema II. (Maksymiec 1997). La ausencia de AA en la parte raíz en el primer experimento se podría deber a dos factores: (i) por un lado la gran cantidad de ERO que se generan a la concentración de cobre probada generando un gran deterioro celular y (ii) por otro lado para que el AA sea regenerado necesita del GSH como donante de electrones.

No se esperaba si, que se encontraran cantidades importantes de AA en el segundo experimento en la parte raíz para los tratamientos con cobre, una explicación posible es que como en el segundo experimento en la planta se encontró menos concentración de cobre que en el primero (Figuras 14 y 15, Tablas 3 y 4 anexos), el AA en la raíz no se haya visto

de igual forma afectado aunque si hubo un cambio similar en los niveles de glutatión en ambos experimentos (Figuras 19 y 20, Tablas 5, 6 y 7 anexos).

Respecto del plomo, se ha visto en plantas de arroz cultivadas con plomo, que éste induce estrés oxidativo, ya que se relaciono un aumento en la concentración de plomo con un aumento en la peroxidación lipídica (Verma y Dubey 2003). Los experimentos realizados indican altos niveles de plomo en la parte aérea y por sobre todo en la raíz, pese a ello no se observó un gran cambio en el nivel de GSH respecto al control, y en cuanto al GSSG se observó un ligero aumento en la parte aérea, pero un importante disminución en la raíz (Figura 16, Tabla 3 anexos). Los resultados observados se podrían explicar debido a que según Verma y Dubey (2003) el plomo incrementa la actividad de la glutatión reductasa esto ayudaría a mantener cierto nivel de GSH en la parte aérea similar al control y explicaría también el leve aumento del GSSG. En la raíz el nivel de GSH se explicaría por este mismo efecto pero la disminución de GSSG en casi un 50% se debería principalmente a que el plomo en la raíz esta siendo preferentemente complejado. El AA por su parte disminuye levemente en la parte aérea y muy levemente en la parte raíz.

No esta totalmente claro como es que el cadmio el cual no es capaz de producir ERO a través de una reacción de Fenton, produce estrés oxidativo, sin embargo se ha encontrado un incremento en la actividad de las enzimas del ciclo Glutatión-Ascorbato en plantas tratadas con Cd (Semane y col. 2007). Por otro lado se ha visto que el cadmio tiene gran afinidad por grupos tiol y que al mismo tiempo es un potente estimulador de la producción de Fitoquelatinas (Zhang y col. 2005), las cuales gracias a la afinidad del cadmio por grupos tioles lo complejarían fácilmente almacenándolo en la vacuola. Esto explicaría el porque la disminución tanto de GSH como de GSSG encontrada en este estudio, ya que por un lado se usa el GSH para los distintos mecanismos de defensa contra ERO y por otro lado también se estarían usando para la síntesis de Fitoquelatinas. La disminución del AA respecto al control se podría explicar debido a que; Si existe un desajuste en la cantidad de GSH disponible por efecto de Cd, se produce también un desbalance en la regulación de ERO debido a que la enzima dehidroascórbico reductasa (DHAR) necesita al glutatión como donante de electrones.

#### 4.9 Efecto de MOS sobre niveles de GSH/GSSG y AA/ADHA

Tanto la MOS1 como la MOS2 producen cambios en los niveles de GSH y GSSG respecto del control. Por un lado la MOS1, provoca una disminución del GSH en la parte aérea y un aumento leve en la parte raíz, en cuanto al GSSG, este en la parte raíz no presenta cambios pero en la parte aérea aumenta respecto al control. Estos datos se correlacionan con el AA ya que también disminuye en la parte aérea y se mantiene en la parte raíz. En cuanto a la MOS2 se observa una importante disminución en la parte aérea y raíz de GSH y un aumento importante de GSSG en la parte aérea pero una mantención en la cantidad encontrada en la parte raíz respecto al control denotando de todas formas un mayor estrés que el tratamiento con MOS1, datos que se condicen con la mayor concentración de los metales encontrados en un estudio de (Mendoza y col. 2004) para el biosólido de donde proviene la MOS2 comparado con el biosólido de donde proviene la MOS1.

En cuanto al efecto metal-MOS sobre los niveles de GSH, AA y sus formas oxidadas, el Cu-MOS1 presente en ambos experimentos generó una mayor disminución de GSH en parte aérea que el cobre libre y de igual modo una disminución de GSSG, esta disminución conjunta de GSH y GSSG se podría explicar por la presencia de otros metales en la MOS1. Algunos de ellos con facilidad para ser quelados por fitoquelatinas y/o con mayor capacidad para inactivar enzimas del ciclo glutatión-ascorbato. Para Cu-MOS2 en el primer experimento el nivel de GSH y GSSG en parte aérea aumenta con respecto al cobre libre dando indicio de un mayor control de las ERO.

Según lo observado para el tratamiento Pb-MOS1 y 2 en la parte aérea se observaron los mismos comportamientos, es decir, una disminución igual de GSH y GSSG con ambas MOS respecto a Pb libre. Donde si hubo diferencias fue en la parte raíz ya que la MOS1 aumento los niveles de GSH y GSSG respecto a Pb libre y la MOS 2 disminuyo considerablemente el GSH y aumento el GSSG. Para el AA se observó una disminución en la raíz y no hubo diferencias en la parte aérea respecto del Pb libre.

En el mismo sentido que el cobre, para el tratamiento Cd-MOS1 disminuyó la cantidad de GSH en la parte aérea y raíz respecto de cadmio libre pero por otro lado aumentó la cantidad de GSSG en parte aérea y en especial raíz, posiblemente debido a un aumento del estrés oxidativo respecto del cadmio libre. Este gran aumento de GSSG en la raíz podría estar relacionado con la disminución de AA en la raíz respecto del Cd libre.

## 5. CONCLUSIONES

1. La electroforesis capilar es una técnica apropiada para el estudio de las formas oxidada y reducida de ácido ascórbico. Fue posible establecer un método para la cuantificación de ácido ascórbico y por diferencia el ácido dehidroascórbico, bajo condiciones de electromigración en zonas, detección directa por absorción UV, modo de polaridad normal y electrolito de alta fuerza iónica.
2. El TCEP fue efectivo como reductor del ácido dehidroascórbico en la matriz ácida constituida por MPA 2%. La aplicación de una concentración de 1mM por 24 horas a temperatura ambiente reduce el ADHA produciendo cantidades cuantificables de ácido ascórbico. El efecto reductor es independiente de la presencia de AA en la muestra.
3. La materia orgánica soluble modifica la biodisponibilidad de los metales pesados en solución, efecto que depende de cada elemento y se manifiesta en un cambio en la concentración de los elementos en la parte aérea y raíz de la planta. A nivel foliar la MOS disminuye la concentración de cobre y cadmio, incrementa la de plomo y no presenta efecto sobre níquel. A nivel de la raíz, el comportamiento es distinto, cobre, plomo y níquel disminuyen su concentración respecto de un tratamiento solo con metal y cadmio la incrementa.
4. La asociación de materia orgánica soluble con materia orgánica coloidal presenta un efecto sinérgico sobre la translocación del metal a la parte aérea de la planta. Este efecto se manifestó para cobre y cadmio en una mayor disminución de su concentración foliar en comparación a la sola aplicación de MOS. Este efecto no fue observado en la raíz.
5. El efecto de cobre cadmio y plomo sobre los sistemas de glutatión/glutatión oxidado y ácido ascórbico/dehidroascórbico en la planta difieren para cada elemento y tipo de tejido. Para los péptidos el efecto se produce principalmente en la raíz. El cobre disminuye los niveles de ambos péptidos, en cambio plomo y cadmio tienen efecto solo sobre glutatión oxidado con disminución e incremento, respectivamente. Para el

sistema ácido ascórbico/dehidroascórbico, los tres elementos disminuyen levemente el nivel de ácido ascórbico foliar, en tanto que en la raíz se observó efecto solo para cobre con disminución. Los experimentos de este estudio no evidenciaron efecto sobre los niveles de ácido dehidroascórbico.

6. La asociación de materia orgánica soluble y metal en comparación al tratamiento solo con metal produce cambios en los niveles de glutatión, glutatión oxidado y ácido ascórbico. Los mayores cambios se observaron para cadmio el cual incrementó los niveles de glutatión oxidado en parte aérea y raíz, en tanto que disminuyó los niveles de glutatión y ácido ascórbico en la raíz. Por su parte, la asociación con plomo incrementó los niveles de ambos péptidos en la raíz.

## 6. REFERENCIAS

1. Alloway B J 1992 Heavy metals in soils. Blackie academic & Professional.
2. Anderson J V, Chevone B I and Hess J L 1992 Seasonal Variation in the Antioxidant System of Eastern White Pine Needles: Evidence for Thermal Dependence. *Plant Physiol.* 98, 501-508.
3. Antonelli M L, D'ascenzo G, Laganà A y Pusceddu P. 2002 Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. *Talanta* 58, 961-967.
4. Asada K 1999 The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.
5. Ashworth D J y Alloway B J 2004 Soil mobility of sewage sludge-derived dissolved organic matter, copper, nickel and zinc. *Environ. Pollut.* 127, 137-144.
6. Ashworth D J y Alloway B J 2007 Complexation of Copper by Sewage Sludge-derived Dissolved Organic Matter: Effects on Soil Sorption Behaviour and Plant Uptake. *Water Air Soil Pollut.* 182, 187-196.
7. Cuypers A, Vangronsveld J y Clijsters H 2000 Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus Vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol. Plant.* 110, 512-517.
8. Dunnivant F M, Jardine P M, Taylor D L y McCarthy J F 1992 Transport of naturally occurring dissolved organic carbon in laboratory columns containing aquifer material. *Soil Science Society of American Journal* 56, 437-444.
9. Freedman J H, Ciriolo M R y Peisach J 1989 The role of glutathione in copper metabolism and toxicity *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.
10. Freeman J L, Persans M W, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering I J y Salt D E 2004 Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in thlaspi nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16, 2176-2191.
11. Garrido T, Mendoza J y Richter P. Efecto de la materia orgánica soluble de los biosólidos sobre la desorción de cobre en suelos. 20, 53-57. 2004. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo.
12. González C. Determinación de Especies de Glutación por Electroforesis Capilar en Plantas bajo Estrés por Cobre. 2005. Tesis, Universidad de Chile.

13. Granato T C, Pietz R I, Knafel G J, Carlson C R, Jr., Tata P y Lue-Hing C 2004 Trace element concentrations in soil, corn leaves, and grain after cessation of biosolids applications. *J. Environ. Qual.* 33, 2078-2089.
14. Gratao P, Polle A, Lea P J y Azevedo R, A. 2005 Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32, 481-494.
15. Griffith O W 1980 Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
16. Hall J L 2002 Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.
17. Herrero-Martinez J M, Simo-Alfonso E, Deltoro V I, Calatayud A y Ramis-Ramos G 1998 Determination of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in vascular and nonvascular plants by capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* 265, 275-281.
18. Ilani T, Schulz E y Chefetz B 2005 Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: role of hydrophobic fractions. *J. Environ. Qual.* 34, 552-562.
19. Imai A, Fukushima T, Matsushige K, Kim Y H y Choi K 2002 Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 36, 859-870.
20. Kabata-Pendias A 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press.
21. Karlsson T, Persson P y Skjellberg U 2006 Complexation of copper (II) in organic soils and in dissolved organic matter--EXAFS evidence for chelate ring structures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2623-2628.
22. Lamb C y Dixon R A 1997 The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
23. Lykkesfeldt J 2000 Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris[2-carboxyethyl]phosphine hydrochloride *Anal. Biochem.* 282, 89-93.
24. Maksymiec W 1997 Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321-342.
25. Maldonado J M 1993 Asimilación de nitrógeno y del azufre. *En Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Eds. Azcon-Bieto J y Talón M. pp 215-236. McGraw-Hill/Interamericana de España.
26. Mendoza J, Garrido T, Castillo G y Ahumada I. Aplicación de biosólidos al suelo toxicidad y efecto sobre la movilidad y biodisponibilidad de metales pesados. 20, 15-25. 2004b. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo.

27. Mendoza J, Soto P, Ahumada I y Garrido T 2004 Determination of oxidized and reduced glutathione, by capillary zone electrophoresis, in Brassica juncea plants treated with copper and cadmium Electrophoresis 25, 890-896.
28. Miller J N y Miller J C 2002 Método de Calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En: Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Ed. Capella I. pgs. 111-155. Pearsons Educación, Madrid.
29. Mittler R 2002 Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7, 405-410.
30. Nagalakshmi N y Prasad M N 2001 Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in Scenedesmus bijugatus Plant Sci. 160, 291-299.
31. Oliver I W, McLaughlin M J y Merrington G 2005 Temporal trends of total and potentially available element concentrations in sewage biosolids: a comparison of biosolid surveys conducted 18 years apart. Sci. Total Environ. 337, 139-145.
32. Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Sanz A y Guillen A 2004 Successive determination of thiamine and ascorbic acid in pharmaceuticals by flow injection analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 34, 551-557.
33. Sadzuka A, Grez R, Mora M, Saavedra N, Carrasco M y Rojas C 2000 Fósforo. En Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA).
34. Schutzenhubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold D L y Polle A 2001 Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. Plant Physiol 127, 887-898.
35. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Bellinghem F, Horemans N, Henck S y Vangronsveld J 2007 Cadmium responses in Arabidopsis thaliana: glutathionemetabolism and antioxidative defence system. Physiol. Plant. 129, 519-528.
36. Smirnoff N, Conklin P L y Loewus F A 2001 Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: A Renaissance: A Renaissance. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. 52, 437-467.
37. Smith I K, Vierheller T L y Thorne C A 1989 Properties and functions of glutathion reductasa in plants. Physiol. Plant. 77, 449-456.
38. Stochkova E M, Tur'yan Ya I, Kuselman I y Shenhar A 1997 Simultaneous voltammetric determination of uric and ascorbic acids in urine. Talanta 44, 1923-1928.
39. Tausz M, Sircelj H y Grill D 2004 The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? J. Exp. Bot. 55, 1955-1962.

40. Tudela D y Tadeo F R 1993 Respuesta y adaptación de las plantas al estrés. *En Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Eds. Azcon-Bieto J y Talón M. pgs. 537-535. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid.
41. Verma S y Dubey R S 2003 Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci*. 164, 645-655.
42. Washko P W, Welch R W, Dhariwal K R, Wang Y y Levine M 1992 Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples. *Analytical Biochemistry* 204, 1-14.
43. Weinberger R 2000 Detection. *En Practical Capillary Electrophoresis*. Pgs. 365-421. Academic Press, San Diego.
44. Wolucka B A, Davey M W y Boerjan W 2001 A high-performance liquid chromatography radio method for determination of L-ascorbic acid and guanosine 5'-diphosphate-l-galactose, key metabolites of the plant vitamin C pathway *Anal. Biochem*. 294, 161-168.
45. Xiaoli L, Shuzhen Z, Wenyong W y Honglu L 2007 Metal sorption on soils as affected by the dissolved organic matter in sewage sludge and the relative calculation of sewage sludge application. *Journal of Hazardous Materials* 149, 399-407.
46. Zhang H, Xu W, Guo J, He Z y Ma M 2005 Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Sci*. 169, 1059-1065.

# ANEXOS

**Tabla 1: Biomasa (g/pote) parte aérea y raíz para Experimento 1**

Tratamiento	R	Parte Aérea					Raíz				
		Biomasa (g/pote)	Promedio	D.E	F	P	Biomasa (g/pote)	Promedio	D.E	F	P
<b>Control</b>	1	2,60	2,72	0,16	2,44	0,055	0,39	0,39	0,01	3,96	<0,01
	2	2,90					0,38				
	3	2,66					0,40				
<b>MOS1</b>	1	2,39	2,51	0,12			0,46	0,45	0,01		
	2	2,52					0,44				
	3	2,62					0,46				
<b>MOS2</b>	1	2,54	2,77	0,25			0,47	0,51	0,05		
	2	2,73					0,51				
	3	3,04					0,55				
<b>Cu</b>	1	2,25	2,12	0,24			0,29	0,29	0,07		
	2	2,28					0,35				
	3	1,84					0,22				
<b>Cu -MOS1</b>	1	2,90	2,82	0,29			0,37	0,38	0,08		
	2	3,06					0,46				
	3	2,49					0,30				
<b>Cu -MOS2</b>	1	3,16	2,79	0,38			0,47	0,40	0,06		
	2	2,40					0,38				
	3	2,81					0,36				
<b>Pb</b>	1	2,50	2,61	0,10	0,38	0,45	0,07				
	2	2,69			0,44						
	3	2,64			0,52						
<b>Pb-MOS1</b>	1	3,43	2,98	0,47	0,52	0,48	0,03				
	2	2,99			0,45						
	3	2,50			0,48						
<b>Pb-MOS2</b>	1	2,70	2,86	0,27	0,44	0,48	0,10				
	2	2,71			0,40						
	3	3,17			0,59						

D.E = Desviación Estándar, R= Repeticiones

**Tabla 2:** Biomasa (g/pote) parte aérea y raíz para **Experimento 2**

Tratamiento	R	Parte Aérea					Raíz				
		Biomasa (g/pote)	Promedio	D.E	F	P	Biomasa (g/pote)	Promedio	D.E	F	P
<b>Control</b>	1	2,31	2,33	0,03	1,75	0,13	0,54	0,55	0,01	0,82	0,62
	2	2,35					0,56				
<b>Cu</b>	1	2,28	2,11	0,25			0,68	0,58	0,14		
	2	1,93					0,48				
<b>Cd</b>	1	2,30	2,25	0,08			0,60	0,55	0,07		
	2	2,30					0,58				
	3	2,16					0,48				
<b>Ni</b>	1	2,46	2,45	0,01			0,50	0,51	0,05		
	2	2,46					0,56				
	3	2,44					0,46				
<b>Cu-MOS1</b>	1	2,19	2,23	0,05			0,59	0,53	0,09		
	2	2,26					0,47				
<b>Cd-MOS1</b>	1	2,24	2,18	0,16			0,46	0,50	0,06		
	2	2,30					0,48				
	3	1,99					0,57				
<b>Ni-MOS1</b>	1	2,04	2,14	0,20			0,36	0,43	0,06		
	2	2,02					0,45				
	3	2,37					0,46				
<b>Cu-MOC</b>	1	2,35	2,23	0,11			0,52	0,51	0,06		
	2	2,13					0,45				
	3	2,23					0,55				
<b>Cd-MOC</b>	1	1,87	2,12	0,22			0,44	0,54	0,09		
	2	2,29					0,59				
	3	2,21					0,58				
<b>Ni-MOC</b>	1	2,44	2,39	0,12	0,58	0,53	0,09				
	2	2,26			0,43						
	3	2,49			0,59						
<b>MOS1</b>	1	2,20	2,39	0,26	0,49	0,56	0,10				
	2	2,57			0,63						
<b>MOC</b>	1	2,23	2,10	0,12	0,47	0,49	0,06				
	2	2,09			0,55						
	3	1,99			0,45						

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 3:** Concentración de metales y macronutrientes en hojas y raíz de tomate para **Experimento 1**

	Tratamiento	Biomasa Prom. (g/pote)	Cu( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>*</sup>	D.E	Pb( $\mu\text{g/g}$ )	D.E	Ca(mg/g)	D.E	Mg(mg/g)	D.E	P(mg/g)	D.E	K(mg/g)	D.E
<b>Parte Aérea</b>	Control		12,9	1,69	nd		32,4	1,60	4,80	0,40	3,00	0,10	68,2	3,10
	MOS1	2,51	12,1	0,61	nd		28,3	0,20	4,50	0,20	2,60	0,10	64,2	3,30
	MOS2	2,77	11,1	1,50	nd		29,2	1,10	4,30	0,30	2,30	0,20	61,1	5,30
	Cu	2,12	105	16,5	nd		27,4	0,90	4,20	0,20	2,70	0,20	70,0	6,70
	Cu-MOS1	2,82	56,2	0,83	nd		28,5	1,50	4,30	0,40	2,40	0,20	59,6	6,50
	Cu-MOS2	2,79	43,0	6,74	nd		29,3	3,00	3,80	0,20	2,30	0,20	63,8	6,50
	Pb	2,61	10,2	0,95	50,0	6,20	30,7	0,80	5,00	0,40	2,50	0,30	63,7	0,10
	Pb-MOS1	2,98	10,3	0,34	55,8	13,1	27,3	0,20	4,20	0,00	2,30	0,20	89,1	7,60
	Pb-MOS2	2,86	10,6	0,70	73,2	5,40	28,2	2,10	4,10	0,40	2,10	0,20	84,3	4,50
<b>Raíz</b>	Control	0,39	29,6	2,42	nd		10,8	1,50	6,40	0,30	2,40	0,50	29,0	4,10
	MOS1	0,45	67,8	4,65	nd		10,5	0,70	4,80	0,20	2,80	0,10	44,1	5,10
	MOS2	0,51	49,7	2,59	nd		9,90	0,50	6,70	0,90	2,50	0,20	27,9	3,40
	Cu	0,29	7759	1615	nd		8,80	0,30	3,90	0,20	2,10	0,20	23,9	0,90
	Cu-MOS1	0,38	1836	285	nd		11,1	0,90	4,00	0,20	2,40	0,20	29,8	2,90
	Cu-MOS2	0,40	2981	567	nd		12,4	0,90	3,70	0,20	2,40	0,20	24,4	3,50
	Pb	0,45	26,0	2,32	21001	3752	7,40	0,20	5,20	0,50	2,70	0,10	37,5	2,50
	Pb-MOS1	0,48	72,5	10,0	11470	1341	7,60	0,90	4,90	0,30	2,90	0,20	34,0	3,70
	Pb-MOS2	0,48	49,5	5,10	14252	2276	9,40	0,70	5,10	0,10	2,90	0,20	30,9	2,10

\* Valores promedio (n = 4), D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 4:** Concentración de metales y macronutrientes en hojas y raíz de tomate para **Experimento 2**

	Tratamiento	Biomasa Prom. (g/pote)	Cu (µg/g)*	D.E	Cd (µg/g)	D.E	Ni (µg/g)	D.E	Ca (mg/g)	D.E	Mg (mg/g)	D.E	P (mg/g)	D.E	K (mg/g)	D.E
<b>Parte Aérea</b>	Control	2,33	95,9	3,68	nd		nd		29,4	0,2	3,90	0,1	2,19	0,13	59,9	6,0
	Cu	2,11	91,3	0,45	nd		nd		27,3	1,8	3,60	0,6	2,00	0,12	50,3	2,6
	Cd	2,25	14,3	1,68	23,8	5,0	nd		31,2	3,4	3,70	0,2	2,26	0,02	60,8	3,1
	Ni	2,45	19,1	3,17	nd		155	4,8	27,5	0,4	4,10	0,6	2,28	0,23	65,6	4,1
	Cu-MOS1	2,22	74,4	2,78	nd		nd		23,2	0,1	3,20	0,1	2,07	0,18	61,0	5,2
	Cd-MOS1	2,17	13,5	0,56	15,6	0,4	nd		23,9	0,4	3,30	0,1	1,93	0,03	51,1	3,5
	Ni-MOS1	2,14	15,1	0,40	nd		146	17	22,8	1,3	3,20	0,1	2,04	0,16	51,3	4,2
	Cu-MOC	2,23	41,2	0,77	nd		nd		24,1	1,4	3,10	0,2	1,84	0,10	44,5	3,4
	Cd-MOC	2,12	11,6	0,79	11,3	0,8	nd		23,2	0,9	3,60	0,2	1,95	0,25	58,3	4,9
	Ni-MOC	2,39	13,7	0,04	nd		128	11	23,3	1,4	3,00	0,2	1,91	0,13	44,6	3,0
	MOS1	2,39	15,2	2,96	nd		nd		23,4	1,5	3,30	0,2	1,83	0,22	43,9	1,5
MOC	2,10	11,5	0,15	nd		nd		24,3	1,5	3,20	0,2	2,06	0,14	47,7	4,2	
<b>Raíz</b>	Control	0,55	26,8	1,20	nd		nd		11,3	2,2	5,00	1,0	2,97	0,24	41,9	6,8
	Cu	0,58	2137	264	nd		nd		11,3	0,2	3,40	0,1	2,60	0,16	33,7	3,8
	Cd	0,55	23,8	3,40	87,1	5,5	nd		10,3	1,2	4,00	0,7	2,59	0,33	44,9	3,2
	Ni	0,51	23,5	2,80	nd		913	37	7,50	1,2	5,70	0,5	2,67	0,63	45,1	3,7
	Cu-MOS1	0,53	1515	229	nd		nd		7,90	0,1	4,60	0,9	3,05	0,20	33,5	3,1
	Cd-MOS1	0,50	113	3,80	224	12	nd		6,60	1,1	5,50	1,0	2,86	0,09	37,8	2,7
	Ni-MOS1	0,43	126	12,7	nd		710	1,4	6,10	1,6	6,00	0,7	3,16	0,11	42,3	2,0
	Cu-MOC	0,51	1721	106	nd		nd		8,40	0,9	5,70	0,5	2,83	0,24	30,4	1,5
	Cd-MOC	0,54	68,0	10,5	201	14	nd		6,60	1,0	4,60	0,5	2,81	0,42	37,2	2,3
	Ni-MOC	0,53	104	10,4	nd		664	96	6,60	1,7	3,50	0,2	2,93	0,35	40,8	2,9
	MOS1	0,56	88,9	3,20	nd		nd		5,50	0,3	3,50	0,2	2,71	0,11	33,4	2,8
MOC	0,49	69,3	3,30	nd		nd		6,10	0,3	3,80	0,4	2,86	0,05	35,9	3,7	

\* Valores promedio (n = 4), D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 5:** Concentración de **GSH** en parte aérea y raíz para el **Experimento 1**

Tratamiento	R	Parte aérea						Raíz					
		Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P	Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P
<b>Control</b>	1	285	400	175	43,7	0,698	0,69	620	570	80,7	14,2	8,70	<0,01
	2	314						482					
	3	601						524					
<b>MOS1</b>	1	259	277	34,6	12,5			667	627	161	25,7		
	2	317						764					
	3	256						450					
<b>MOS2</b>	1	204	249	131	52,4			265	334	68,6	20,6		
	2	147						402					
	3	396						335					
<b>Cu</b>	1	293	288	107	37,2			nd					
	2	179						nd					
	3	393						nd					
<b>Cu-MOS1</b>	1	136	177	38,9	22,0			nd					
	2	214						nd					
	3	180						nd					
<b>Cu-MOS2</b>	1	164	319	211	66,2	nd							
	2	233				nd							
	3	559				nd							
<b>Pb</b>	1	201	413	269	65,2	638	571	58,7	10,3				
	2	322				528							
	3	716				547							
<b>Pb-MOS1</b>	1	395	254	137	54,0	1325	1098	380	34,6				
	2	247				659							
	3	121				1309							
<b>Pb-MOS2</b>	1	142	279	119	42,7	257	244	11,4	4,69				
	2	361				235							
	3	332				241							

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 6:** Concentración de **GSSG** en parte aérea y raíz para el **Experimento 1**

Tratamiento	R	Parte aérea						Parte raíz					
		Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P	Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P
<b>Control</b>	1	830	766	138	18,0	2,33	0,064	610	483	126	26,1	5,42	<0,01
	2	860						554					
	3	608						437					
<b>MOS1</b>	1	927	891	76,8	8,62			379	492	152	30,9		
	2	943						665					
	3	802						433					
<b>MOS2</b>	1	1027	1154	182	15,8			420	483	55,5	11,5		
	2	1362						503					
	3	1072						525					
<b>Cu</b>	1	1001	832	164	19,7			nd	----	----	----		
	2	675						nd					
	3	821						nd					
<b>Cu-MOS1</b>	1	616	725	159	21,9			nd	----	----	----		
	2	654						nd					
	3	907						nd					
<b>Cu-MOS2</b>	1	650	747	96,5	12,9	nd	----	----	----				
	2	747				nd							
	3	843				nd							
<b>Pb</b>	1	1048	956	93,6	9,79	256	275	49,5	18,0				
	2	958				331							
	3	861				238							
<b>Pb-MOS1</b>	1	787	839	122	14,6	575	621	47,0	7,57				
	2	978				619							
	3	751				669							
<b>Pb-MOS2</b>	1	1044	818	242	29,5	489	383	98,9	25,8				
	2	846				368							
	3	564				293							

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 7:** Concentración de **GSH** y **GSSG** en parte aérea y raíz para el **Experimento 2**

	Tratamiento	R	GSH						GSSG					
			Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P	Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P
Parte Aérea	Control	1	714	592	174	29,4	11,4	0,01	452	530	109	20,6	0,53	0,72
		2	469						607					
	Cu	1	382	424	58,7	13,9			494	832	478	57,4		
		2	465						1170					
	Cd	1	452	415	52,9	12,7			432	496	89,9	18,1		
		2	378						560					
	Cu-MOS1	1	356	362	8,63	2,38			511	402	154	38,4		
		2	368						293					
	Cd-MOS1	1	381	374	9,26	2,47			764	719	64,4	8,96		
		2	368						673					
Raíz	Control	1	772	693	113	16,3	0,62	0,57	nd	---	---	---	6,73	0,06
		2	613						nd					
	Cu	1	nd	---	---	---			nd	---	---	---		
		2	nd						nd					
	Cd	1	590	666	107	16,2			81	85,5	6,09	7,12		
		2	742						90					
	Cu-MOS1	1	nd	---	---	---			nd	---	---	---		
		2	nd						nd					
	Cd-MOS1	1	275	276	1,41	0,51			553	499	76,8	15,4		
		2	277						445					

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 8:** Concentración de AA en parte aérea y raíz para el **Experimento 1**

Tratamiento	R	Parte aérea						Parte raíz					
		Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P	Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P
Control	1	689	702	60,7	8,64	3,24	0,02	1087	1111	169	15,2	2,82	0,066
	2	769						1259					
	3	650						1217					
MOS1	1	553	536	14,9	2,79			1025	1065	35,9	3,37		
	2	524						1077					
	3	531						1093					
MOS2	1	684	624	120	19,3			890	974	199	20,5		
	2	485						1201					
	3	701						830					
Cu	1	560	543	33,7	6,21			nd	----	----	----		
	2	504						nd					
	3	565						nd					
Cu-MOS1	1	516	541	26,7	4,94			nd	----	----	----		
	2	569						nd					
	3	538						nd					
Cu-MOS2	1	513	540	32,0	5,92			nd	----	----	----		
	2	533						nd					
	3	575						nd					
Pb	1	593	554	41,0	7,40	926	1022	157	15,3				
	2	556				938							
	3	511				1203							
Pb-MOS1	1	502	538	32,4	6,02	627	825	248	30,1				
	2	550				744							
	3	563				1103							
Pb-MOS2	1	579	662	98,7	14,9	814	794	80,6	10,2				
	2	771				705							
	3	636				863							

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar

**Tabla 9:** Concentración de **AA** en parte aérea y raíz para el **Experimento 2**

Tratamiento	R	Parte aérea						Raíz					
		Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P	Concentración encontrada (nmol/g)	Promedio (nmol/g)	D.E	CV%	F	P
<b>Control</b>	1	938	1019	114	11,2	5,21	0,05	1381	1275	150	11,8	4,95	0,054
	2	1099						1169					
<b>Cu</b>	1	642	707	93,0	13,2			1044	1114	99,5	8,93		
	2	773						1185					
<b>Cd</b>	1	747	775	38,7	5,00			1157	1071	121	11,3		
	2	802						985					
<b>Cu-MOS</b>	1	713	734	30,1	4,10			815	949	189	20,0		
	2	756						1083					
<b>Cd-MOS</b>	1	681	741	84,0	11,3			767	710	81,0	11,4		
	2	800						653					

R= Repetición, D.E.= Desviación Estándar