

INTERACCIÓN DE UNA MEZCLA DE OLIGOGALACTURÓNIDOS CON EL IÓN Cu^{2+} Y SU EFECTO SOBRE LAS RAÍCES DE PLÁNTULAS DE TOMATE

O. Cartaya[✉], Yuliem Mederos, Inés Reynaldo y C. Peniche

ABSTRACT. Pectimorf is a plant bioactive compound obtained in the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) from citrus peel. This product is constituted by a mixture of α 1-4 oligogalacturonides with a degree of polymerization between 7 and 16. Each galacturonide residue has a terminal carboxyl group allowing the formation of complex with heavy metals. In this work, a metal:ligand molar ratio of 1:1 and 1:2 between oligogalacturonides and Cu^{2+} was established. Changes in oligogalacturonide structures as a consequence of their bound with Cu^{2+} ion were identified by IR-spectroscopy. On the other hand, some trials were done to analyze the possibility that the oligogalacturonides could protect tomato seedlings growing at toxic levels of metal, being evidenced a bigger radical growth and a decrease of the number of roots in the plants treated with the product, effects that counteract those of toxicity for heavy metals.

Key words: pectins, *Lycopersicon esculentum*, heavy metals, vegetable products

RESUMEN. El Pectimorf está constituido por una mezcla de oligogalacturónidos, que se obtiene en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) a partir de la corteza de los cítricos. Este producto presenta un grado de polimerización entre 7 y 16, con un grupo carboxílico terminal, que facilita la formación de enlaces con los metales pesados formando complejos. En este trabajo se establece la relación estequiométrica metal/ligando entre la mezcla de oligogalacturónidos y el ión Cu^{2+} , evidenciándose una relación 1:1 y 1:2. Por espectroscopía infrarroja, se identificaron las principales afectaciones provocadas en la estructura de los constituyentes de la mezcla por el enlace con el metal. Por otra parte, se realizaron ensayos analizando la posibilidad de que la mezcla de oligogalacturónidos pudiera proteger a plántulas de tomate cultivadas con niveles tóxicos de metal, evidenciándose un mayor crecimiento radical y una disminución del número de raíces en las plantas tratadas con el producto, efectos que contrarrestan el de la toxicidad por metales pesados.

Palabras clave: pectinas, *Lycopersicon esculentum*, metales pesados, productos de origen vegetal

INTRODUCCIÓN

En el medio agrícola, en particular en el suelo, el contenido de metales pesados debería ser únicamente función de la composición del material original y de los procesos edafogénicos que dan lugar al suelo. Pero la actividad humana incrementa el contenido de estos metales en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas, las que pueden provenir de la aplicación sucesiva y masiva de los pesticidas y fertilizantes químicos, o el aprovechamiento de las aguas residuales y los residuos urbanos e industriales (1, 2).

La excesiva concentración de metales pesados en los suelos puede resultar en una disminución de la actividad microbiana y de la fertilidad del suelo, así como de la

pérdida de los rendimientos por alteración en la fisiología de las plantas (3).

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables y dado que la remoción de la contaminación de metales pesados de los suelos es una tarea difícil, se hace necesario buscar alternativas capaces de modificar la adsorción y el transporte de estos metales pesados (4).

Es conocido que uno de los mecanismos de tolerancia más importantes, utilizado por las plantas para reducir la toxicidad por metales pesados, lo constituye la formación de complejos con ligandos orgánicos. En un contexto ecológico, los agentes de quelatación orgánicos pueden tener dos efectos sobre los iones metálicos tóxicos: promover la solubilización y el transporte de los iones metálicos, o secuestrar al ión metálico tóxico y disminuir su biodisponibilidad en las plantas (5).

Los derivados de pectinas presentan una alta proporción de cargas, lo cual les permite la formación de enlaces con los metales pesados formando complejos. Sin embargo, no está establecida la relación entre el efecto que se produce por el acomplejamiento de los polisacáridos con los metales pesados en la detoxificación

Ms.C. O. Cartaya, Investigador Agregado; Yuliem Mederos, Reserva Científica y Dra.C. Inés Reynaldo, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, CP 32 700; Dr.C. C. Peniche, Profesor Titular del Laboratorio de Biomateriales (IMRE), Universidad de La Habana, Cuba.

✉ ocartaya@inca.edu.cu

y la función que ejercen como moléculas señales en los procesos de crecimiento y desarrollo (6, 7).

En el presente trabajo se establece por primera vez la afinidad de iones metálicos con una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf); además, se estudia la posibilidad de disminuir la toxicidad provocada por los metales pesados sobre la raíz de plantas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

La mezcla de oligogalacturónidos se obtuvo en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas a partir de la hidrólisis enzimática de pectina (SIGMA), según la metodología propuesta por Cabrera (8).

Determinación de la relación estequiométrica. La relación estequiométrica metal-ligando se realizó a través del método de la relación molar (9), utilizando 10 mL de CuCl_2 0,02 M y 10 mL de una solución de la mezcla de oligogalacturónidos ($1,025 \times 10^{-2}$ M) y 10 mL de ácido poligalacturónico comercial (SIGMA) $1,030 \times 10^{-2}$ M en cada caso, según lo señalado en la Tabla I; el volumen final se ajustó a 10 mL con agua destilada. Las muestras se filtraron y se midió la absorbancia a 720 nm.

Tabla I. Preparación de las soluciones a diferentes relaciones metal/ligando

Beaker	Metal (mL)	Ligando (mL)
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	4	1
5	5	1
6	6	1
7	7	1

Estudio del complejo en estado sólido. El complejo sólido de la mezcla de oligogalacturónidos y el ión metálico Cu^{2+} se obtuvo por agitación de 50 mL de la solución de la mezcla de oligogalacturónidos ($1,025 \times 10^{-2}$ M) con solución de CuCl_2 a una concentración de 2×10^{-3} M; la solución se agitó durante 1 h y se enfrió a una temperatura de 10°C por 24 horas, posteriormente el precipitado obtenido fue centrifugado y secado a 60°C para el análisis por IR.

Efecto de la mezcla de oligogalacturónidos en las raíces de tomate cultivado con niveles altos de toxicidad. Se utilizaron semillas de tomate de la variedad Amalia crecidas en recipientes plásticos de 0.3 L de capacidad con arena sílice; los tratamientos fueron:

- ✦ Semillas imbibidas durante cuatro horas en agua (control)
- ✦ Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 10 ppm
- ✦ Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 30 ppm

Se utilizaron cinco frascos por cada tratamiento, con una planta cada uno y el experimento se realizó con tres réplicas. Las plantas fueron suplementadas mediante

solución nutritiva con exceso de iones Cu^{2+} y el riego se realizó según las exigencias del cultivo.

A los 25 días de germinadas las semillas se evaluaron la longitud radical y el número de raíces.

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

RESULTADOS

Para establecer la naturaleza química de una especie en solución, deben realizarse estudios que conduzcan a obtener información en tres aspectos: en primer lugar, la relación estequiométrica entre los componentes; en segundo lugar, la disposición espacial de los átomos o estereoquímica y, en tercer lugar, las magnitudes termodinámicas asociadas a la estabilidad y reactividad de las especies.

Por medio del método de la relación molar, es posible establecer la relación estequiométrica de los diferentes complejos que pueden formarse en una reacción en disolución acuosa. La determinación de la relación estequiométrica existente entre el ácido poligalacturónico (comercial) y la mezcla de oligogalacturónidos obtenida en el INCA (Pectimorf) con el ión metálico Cu^{2+} se muestra en la Figura 1; las curvas muestran un cambio de pendiente para una relación molar en ambos casos de 0.3, siendo indicativo de la completa formación del complejo, además, se observa un segundo cambio de pendiente a una relación molar de aproximadamente 0.45, poniendo de manifiesto la formación de otro complejo.

El cambio de pendiente observado alrededor de la relación molar 0.45 es más brusco que en la relación 0.3, lo cual indica que el primer complejo presenta una constante de estabilidad mayor, mientras que para el segundo complejo la disociación es mayor. También se evidencia un mayor acomplejamiento de los iones Cu^{2+} en el caso de la mezcla de oligogalacturónidos.

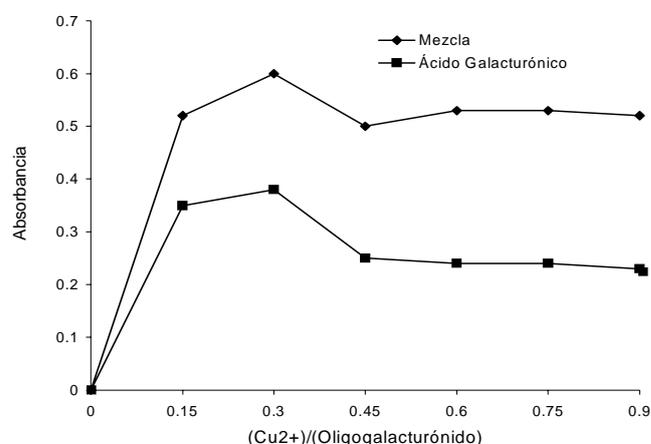


Figura 1. Estudio de la relación molar ligando-metal a 720 nm

Estos resultados coinciden con otros encontrados (10) al estudiar de forma teórica el comportamiento del ácido galacturónico frente a diferentes iones metálicos, los cuales demostraron que era posible que se formaran complejos con relación estequiométrica 1:1 y 1:2 entre el ácido galacturónico y los iones metálicos. Además, al estudiar la relación estequiométrica entre iones metálicos y diferentes polisacáridos provenientes de varias especies de plantas, se han encontrado valores similares en la relación estequiométrica (11, 12). Otros estudiaron a partir de rahmnogalacturanos (RGI) obtenidos del tejido vegetal, la formación de complejos con relación estequiométrica 1/2 (13), incrementándose la formación de dímeros en el orden creciente de Pb^{2+} , La^{3+} y Ca^{2+} , siendo todos los complejos formados idénticos y dependiendo en gran medida de la concentración y del pH del medio.

Los estudios del complejo en estado sólido permiten conocer los principales cambios estructurales producidos en la molécula del ligando cuando se forma el complejo. En la Figura 2 se muestra el espectro infrarrojo del complejo obtenido con el ión metálico Cu (II). El espectro del complejo muestra bandas anchas del O-H y del C-H en la región lejana, indicando bandas individuales mezcladas, lo que hace difícil la asignación de algunas bandas individuales.

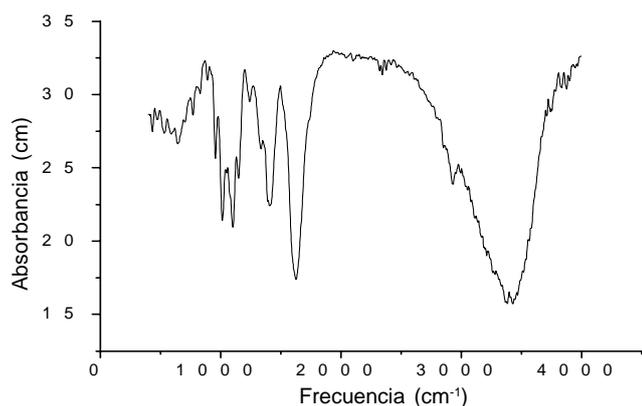


Figura 2. Espectros IR del complejo Cu (II)-mezcla de oligogalacturónidos

Las vibraciones estrechas del enlace intermolecular del grupo hidroxilo O-H en los polisacáridos libres exhiben bandas en la región de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, que luego de afectadas por la ionización, exhiben bandas anchas cercanas a 3400 cm^{-1} con un hombro cercano a 2900 cm^{-1} . Los polisacáridos libres presentan bandas debidas al acoplamiento de las vibraciones $\nu_{\text{C-O}}$ (múltiple: 1245 cm^{-1} y 1330 cm^{-1}) y δ_{OH} (1415 cm^{-1}), y $\nu_{\text{C=O}}$ (1635 cm^{-1}) que se presenta como una banda ancha. Por otro lado, el fuerte acoplamiento vibracional en el anillo de los grupos COH, CH_2 y CCH muestra bandas mezcladas alrededor de 1400 cm^{-1} ; esto puede ser provocado por la formación del complejo metálico, además, las vibraciones de valencia del C-O y del C-C se observan en la región $1140\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ y también aparecen bandas mezcladas aproximadamente a 1050 cm^{-1} por la formación del complejo. Resultados

obtenidos al estudiar los complejos de Zn^{2+} -polisacárido (14) confirman que en la región anomérica ($950\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) se muestran bandas muy débilmente marcadas en la mayoría de los α -anómeros, inclusive en aquellos casos donde se han utilizado los β -anómeros en la síntesis del complejo; la presencia en los complejos de los α -anómeros puede ser atribuida a su estabilidad termodinámica si se compara con los β -anómeros que son productos cinéticamente controlados.

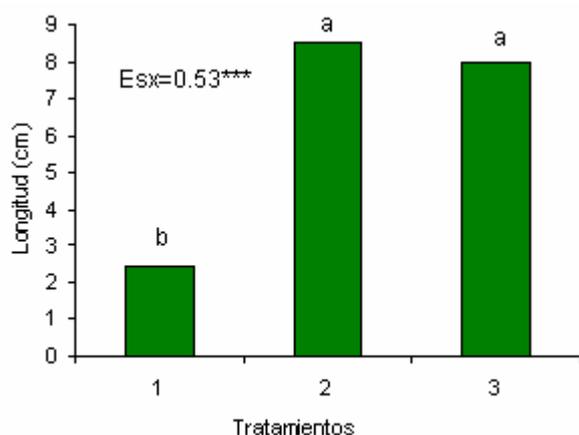
La alta disponibilidad de metales pesados en las plantas induce un estrés iónico, claramente distinguible del estrés salino. Los metales pesados no afectan el crecimiento de las plantas por una disminución significativa del potencial osmótico del sustrato, sino por su propia toxicidad. Un exceso de metales pesados o de sus quelatos solubles puede inducir una serie de alteraciones bioquímicas y fisiológicas, entre las que se encuentra la inhibición del crecimiento de la raíz (15, 16).

Se ha sugerido que la disminución del crecimiento de la expansión celular inducida por los metales pesados puede originarse de los efectos que tienen sobre el metabolismo o el transporte de las auxinas; de ahí la importancia de utilizar diferentes sustancias reguladoras del crecimiento tipo auxínico para atenuar los efectos tóxicos.

En los últimos años se han utilizado reguladores del crecimiento en la fitorremediación de plantas, tales como auxinas y citoquininas, para disminuir la contaminación en las plantas por metales pesados, pues estos reguladores potencialmente incrementan la velocidad de crecimiento y la biomasa en plantas hiperacumuladoras (17).

En la Figura 3 se muestra el efecto del Cu^{2+} sobre la longitud de la raíz de plantas de tomate tratadas con la mezcla de oligogalacturónidos, donde se puede observar que la aplicación de la mezcla provocó un aumento en la longitud radical en relación con las plantas crecidas en el medio de Cu^{2+} sin tratamiento con la mezcla; es de señalar que entre las concentraciones de la mezcla utilizadas no existieron diferencias significativas y estas a su vez difirieron del control. Otros resultados demuestran que las raíces de las plantas se acortan y engrosan (18), debido a que los iones metálicos actúan directamente sobre el metabolismo, interfiriendo en la transferencia de iones a través de las membranas celulares, lo cual afecta posteriormente la habilidad de la planta para la absorción de agua y nutrientes del suelo.

Los altos valores de la longitud de las raíces producidas por las plantas a las que se les aplicaron oligogalacturónidos, pueden ser consecuencia de la posible formación de quelatos solubles, los cuales incrementan la traslocación de metales del sustrato a la planta (19), lo cual no permite apreciar el efecto estimulador del crecimiento que también poseen los oligogalacturónidos y que ha sido observado en diferentes cultivos (20).

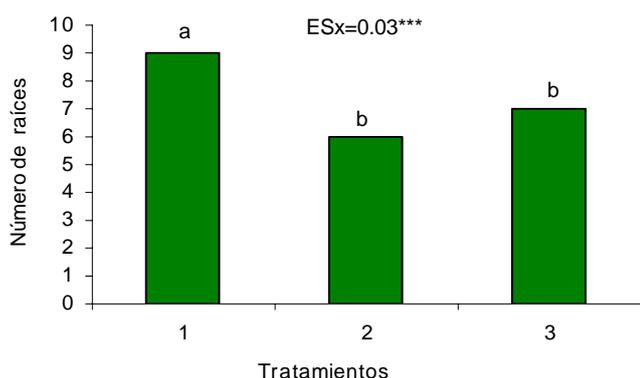


- 1- Semillas imbibidas durante cuatro horas en agua (control),
- 2- Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 10 ppm
- 3- Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 30 ppm

Figura 3. Efecto del Cu^{2+} en la longitud radical de plantas de tomate tratadas con la mezcla de oligogalacturónidos

La toxicidad por metales no solo afecta la longitud de la raíz primaria, sino que cambia la arquitectura del sistema radical completo, de forma tal que se ha visto que la formación de raíces laterales es promovida por las concentraciones tóxicas de metales, lo que provoca más densidad y compactación del sistema radical, mientras que la densidad de los pelos radicales generalmente indican que la toxicidad altera el balance hormonal de las raíces (21).

En la Figura 4 se muestra el efecto del ión Cu^{2+} en el número de raíces de las plantas de tomate, donde se observa que las plantas tratadas con la mezcla de oligogalacturónidos presentaron menor número de raíces que el control, existiendo diferencias significativas entre ellas y el control.



- 1- Semillas imbibidas durante cuatro horas en agua (control),
- 2- Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 10 ppm,
- 3- Semillas imbibidas durante cuatro horas con mezcla de oligogalacturónidos 30 ppm

Figura 4. Efecto del Cu^{2+} en el número de raíces de plantas de tomate tratadas con la mezcla de oligogalacturónidos

Como se puede observar, las plantas que crecieron con la aplicación de la mezcla de oligogalacturónidos presentan una mayor longitud de la raíz principal y un menor número de raíces laterales, al ser comparadas con el control que no fue tratado con el producto en estudio, lo cual puede indicar que estos presentaron una mayor resistencia a la toxicidad por los iones Cu^{2+} y dentro de las concentraciones de la mezcla utilizada, a pesar de no existir diferencias significativas entre ellas, las de 10 ppm mostraron los mejores resultados.

En las investigaciones realizadas se ha encontrado que algunos reguladores del crecimiento, tales como los ácidos naftalenacético e indolbutírico, además de aumentar la biomasa, aumentan la absorción por las plantas de diferentes metales pesados excepto el Cu^{2+} , cuando ellas se aplican en el rango de 10 a 1 000 mg.L^{-1} (22), lo que demuestra la superioridad del uso de los oligogalacturónidos en la absorción de este metal pesado.

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

REFERENCIAS

1. Reynaldo, I.; Cartaya, O.; Menéndez, Y. y Utria, E. Los metales pesados, una amenaza para la vida. *Agricultura Orgánica*, 2002, no. 3, p. 5-9.
2. Henning, B.; Snyman, H.; Forster y Martin, A. Plant-soil interactions of sludge-borne heavy metals and the effect on maize (*Zea mays* L.) seedling growth. *Water SA*, 2001, vol. 27, no. 1, p. 71-79.
3. Leopold, I.; Günther, D.; Schmith, J. y Neumann, D. Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 1999, vol. 50, p. 1323-1328.
4. Hendrik, K.; Zhao, F. J.; Brawn, H. y Mc Grath, S. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thalasspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 1999, vol. 199, p. 305-311.
5. Reynaldo, I.; Alfonso, C. M.; Cartaya, O.; Ramírez, M. A. y Pellón, A. Biorremediación, una alternativa ecológica y viable para secuestrar iones metálicos. *Jornada Ambiental del CNIC*, 2004, p. 31-32.
6. Cescutti, P. y Rizzo, R. Divalent cation interactions with oligogalacturonides. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, p. 3262-3267.
7. Manunza, B.; Deiana, S.; Pintore, M. y Gessa, C. Quantum chemical modeling of the metal-pectin substances interactions. A molecular orbital study of the complexes of calcium (II), cooper (II) and copper (I) with D-galacturonic acid. *Inorg. Chem Act*, 2001, vol. 46, p. 314-318.

8. Cabrera, J. C. "Obtención de una mezcla de oligogalacturónidos a partir de corteza de cítrico". [Tesis de grado] ; Universidad de La Habana, 2000.
9. Carrasquero, A. y Adams, M. Estudio del complejo amarillo vanadomolibdofosfórico para el análisis de fósforo en suelos. *Revista VENEZUELOS* Depósito Legal DLPP, 2002, vol. 3, no. 2, p. 83-88.
10. Manunza, B.; Deiana, S.; Pintore, M. y Gessa, C. A molecular dynamics investigation on the occurrence of helices in Polygalacturonic acid.: Bruno Manunza, 2000, html, 24 de abril 2004.
11. Merce, A. L. R.; Lombardi, S. C.; Mangrich, A. S.; Reicher, F.; Szpoganicz, B. y Sierakowski, M. R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cassia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu^{2+} using potentiometry and EPR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 1998, vol. 35, p. 13-20.
12. Merce, A. L. R.; Fernandes, E.; Mangrich, A. S. y Sierakowski, M. R. Evaluation of the complex of Galactomannan of *Leucaena leucocephala* and Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . *J. Braz. Chem. Soc.*, 2000, vol. 11, no. 3, p. 224-231.
13. Ishii, T.; Matsunaga, T.; Pellerin, P.; O'Neill, M. y Albersheim, P. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan. II. Self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 19, p. 13098-13104.
14. Bandwar, R.; Chebroolu, R.; Giralt, M.; Hidalgo, J. y Kulkarni, G. U. Transition-metal saccharide chemistry and biology: Saccharide complexes of Cu (II) and their effects on *in vivo* metallothionein synthesis in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1997, vol. 138, p. 234-259.
15. Blancaflor, E.; Jones, D. L. y Girol, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminium induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, no. 1, p. 159-172.
16. Whiting, S.; Jonathan, L.; Mc. Groth, S. y Baker, A. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thalasspi caerulescens*. *The Science of the Total Environment*, 2000, vol. 145, p. 199-210.
17. Fuentes, H.; Khoo, C.; Pe, T.; Muir, S. y Khan, A. G. Phytoremediation of a contaminated mine site using plant growth regulators to increase heavy metal uptake. En: Waste treatment and environmental impact in the mining industry, 2000, vol. I. Los Angeles:University of California, 2000.
18. Budíková, S.; Ciamporová, M.; Ověčka, M. y Polonyi, J. Structural characterization of maize root tip cell under aluminium stress. *Acta FRN Univ. Comen.*, 1997, vol. 29, p. 47-52.
19. Alkorta, I.; Hernández-Allica, J.; Becerril, I.; Amezcaga, I.; Albizu, I.; Onaindia, M. y Garbisu, C. Chelate-enhanced phytoremediation of soil polluted with heavy metals. *Environment Science and Bio.*, 2004, vol. 100, p. 1-16.
20. González, Y.; Reynaldo, I. y Cabrera, J. C. Influencia de oligogalacturónidos en la germinación y el enraizamiento de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) variedad Amalia. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 4, p. 17-25.
21. Tsakelidou, K.; Karagiannidis, N. y Bladenopoulou, S. Effects of calcium carbonate and organic matter on soil aluminum, manganese, iron, zinc and copper and their concentration in corn plants in Greek acid soils. *Agrochimica*, 1999, vol. 43, no. 2, p. 89-100.
22. Bonilla, I. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Barcelona:Universidad de Barcelona. 2000.

Recibido: 3 de enero de 2005

Aceptado: 30 de agosto de 2005

DIPLOMADOS

Precio: 2000 CUC

*Consultores de estadística y diseño experimental
en las investigaciones agrícolas y veterinarias*

*Coordinador: Dr.C. Alberto Caballero Núñez
Duración: 1 año*

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 86-3773
Fax: (53) (64) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu