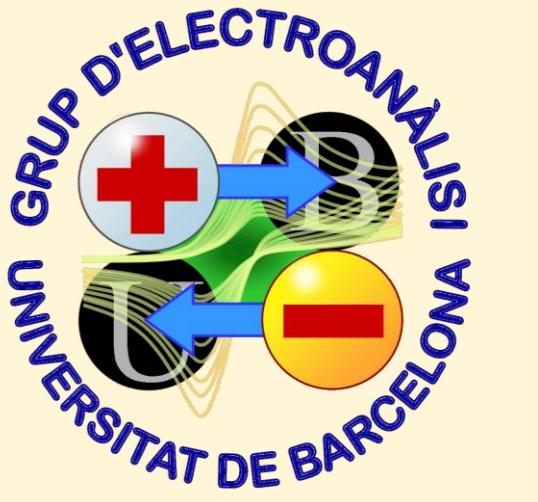


Determinació de fitoquelatines com a indicadors de contaminació per metalls en plantes: efecte en l'espècie *latuca sativa*



N. Rojas –Villar¹, C. Ariño¹, S. Díez².

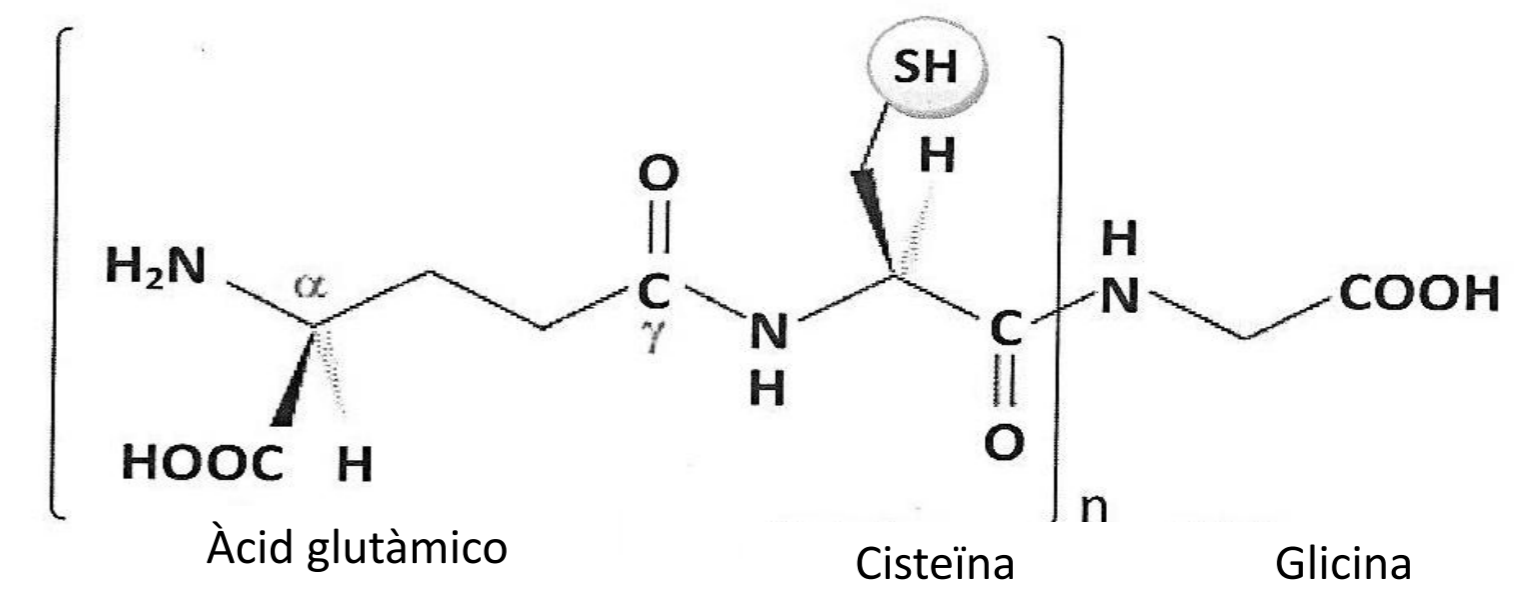
1) Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica - Secció Química Analítica - Facultat de Química – Universitat de Barcelona
2) Departament de Química Ambiental - Institut d'Avaluació Ambiental i Investigació d'Aigües IDAEA-CSIC- Barcelona



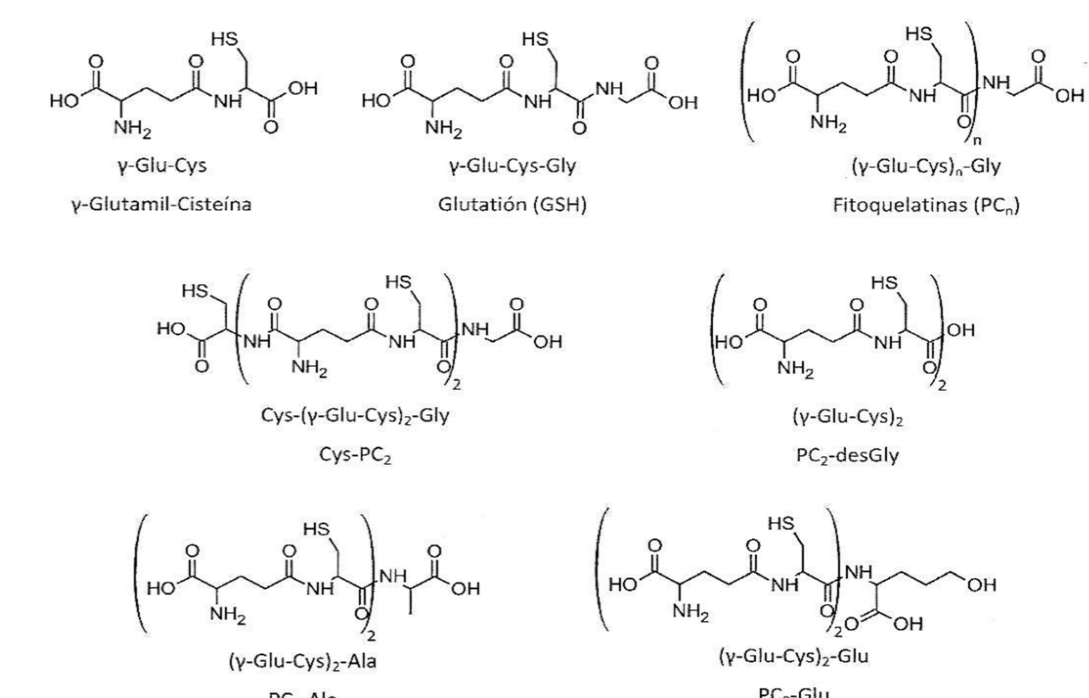
INTRODUCCIÓ

Les fitoquelatines (PC_n) són petits pèptids rics en cisteïna que sintetitzen les plantes, algues i fongs com un mecanisme de detoxificació per l'estrès generat a causa de l'absorció de metalls pesants. Les fitoquelatines tenen una estructura general (γ-Glu-Cys)_n-Gly on n varia de 2 a 5, i poden existir també diverses isòformes, les quals difereixen en algun d'aquests aminoàcids. A causa de la relació directa entre l'estrès metàl·lic i la síntesi de PC_n, el contingut d'aquests compostos es pot considerar un bon indicador de l'exposició de la planta a metalls pesants.

L'objectiu d'aquest estudi és avaluar el nivell de contaminació per metalls pesants en enciams de l'espècie *latuca sativa* de la varietat Meravella, crescuts en una àrea del Parc Agrari del Baix Llobregat. S'han considerat quatre zones de mostreig exposades a diferents graus de contaminació viària. Igualment, s'han cultivat mitjançant un cultiu hidropònic i en ambient controlat enciams que s'han sotmès a l'acció de Ni²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, a diferents nivells de concentració, per avaluar i comparar els seus efectes. La determinació de PC_n s'ha fet per HPLC amb detecció amperomètrica i la determinació dels metalls, tant en les plantes com en el medis de creixement, s'ha fet per ICP. Les dades obtingudes s'han correlacionat entre elles per analitzar els efectes.



Estructura general de les fitoquelatines. Es mostren els tres aminoàcids que la formen i es destaca el grup sulfhidril que és el més reactiu



Estructura dels compostos a determinar

Instrumentació

Aplicació d'HPLC amb detecció amperomètrica amb un elèctrode de carboni vitrificat (GCE)

Separació cromatogràfica:

Elució isocràtica

Fase mòbil

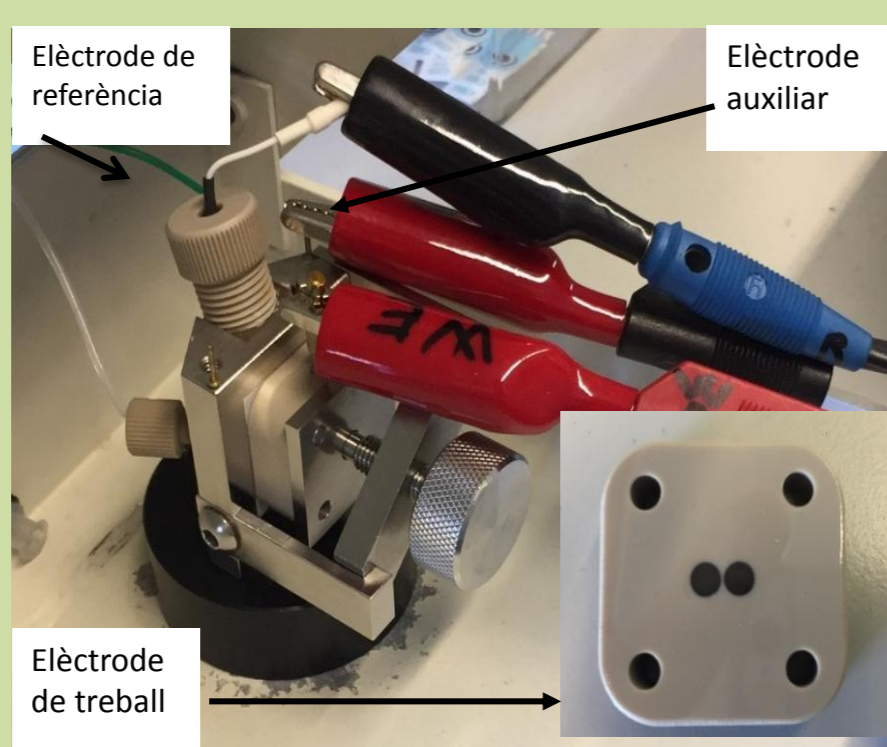
- Solvent A NaCl 0,1 mol L⁻¹ i HCOOH 1%, pH 2,0

- Solvent B : Acetonitril amb 1% HCOOH

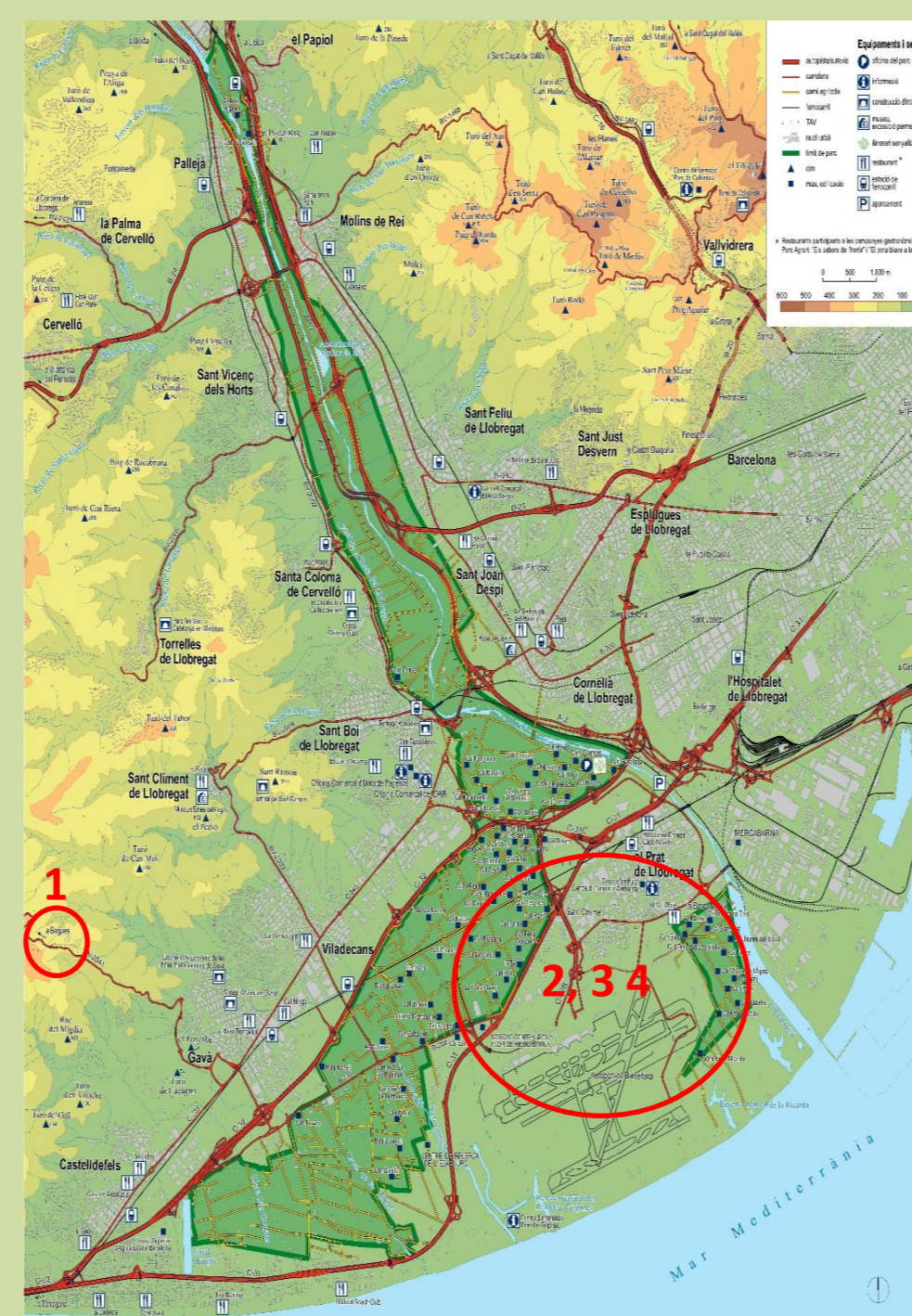
Cabal 1,2 mL min⁻¹

Detecció amperomètrica

- Potencial de treball 1,2 V



Zones de mostreig



Mapa del Parc Agrari del Baix Llobregat on s'indiquen els 4 punts de mostreig dels enciams, la zona 1 es troba a Begues (cultiu de control), la zona 2 està propera a l'aeroport, la zona 3 regada pel canal de la Infanta i propera a un efluent d'aigües residuals i per últim la zona 4 es troba propera a una zona amb contaminació viària)

Cultiu hidropònic



Cultiu hidropònic d'enciams Meravella utilitzant solució nutritiva de Hoagland i sotmèses a l'acció de Ni²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, a diferents nivells de concentració (0,1, 10, 20 i 50 mg L⁻¹).

Tractament de la mostra



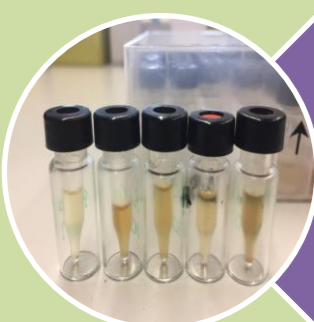
Moltura fins una pols en presència de nitrogen líquid i en un morter de ceràmica i emmagatzematge a -80°C



Extracció dels compostos tiòlics a partir de 200 mg de mostra amb 500 µl d'aigua ultrapura i agitació durant 1 hora a 1500 rpm



Filtració en filtres de nylon de 0,45 µm

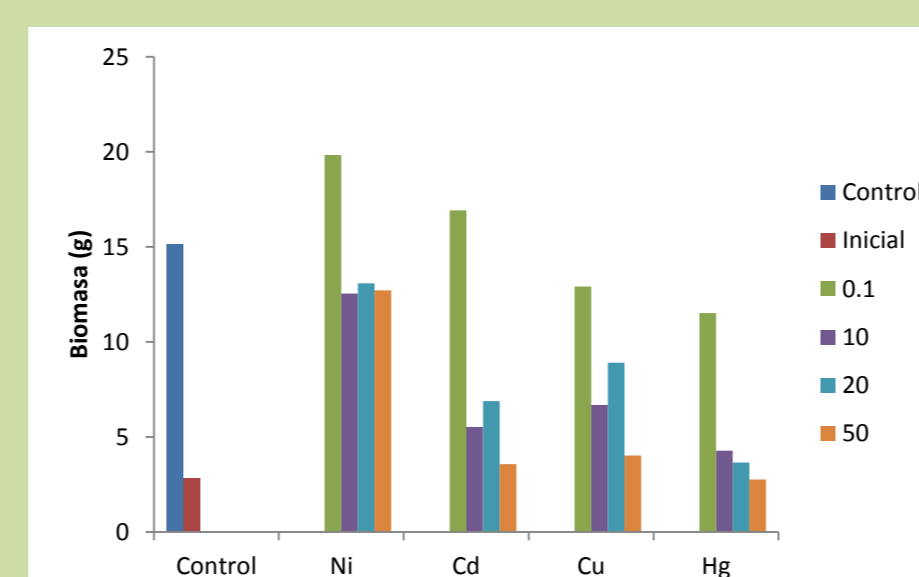


Anàlisi de la mostra en el cromatògraf

Determinació de metalls

El mercuri total en fulles d'enciam Meravella es va determinar utilitzant un Advanced Mercury Analyzer ESTIMA-254 de LECO, que es basa en una combustió de la mostra i la detecció per espectrometria d'absorció atòmica. El coure, el níquel i el cadmi van ser determinats per ICP-MS, utilitzant el mètode 200.2 EPA 1994.

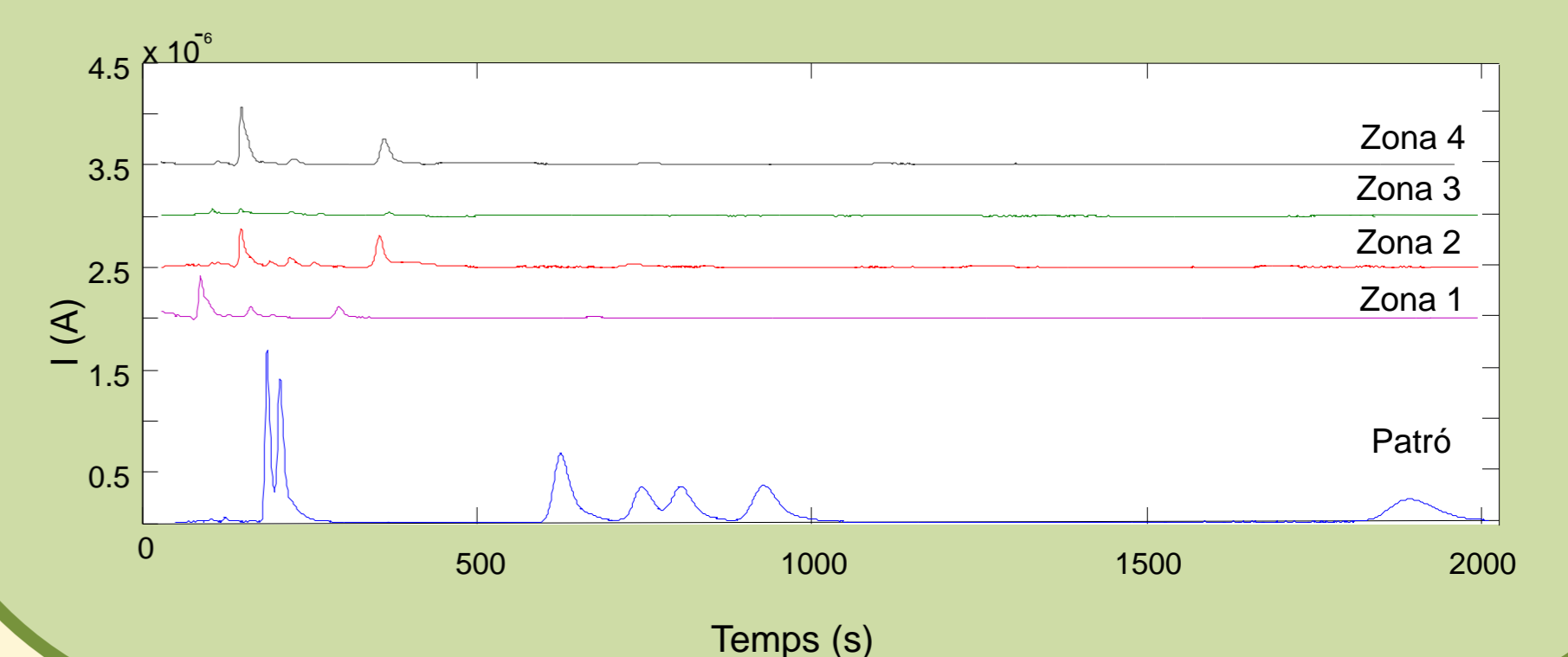
Biomassa



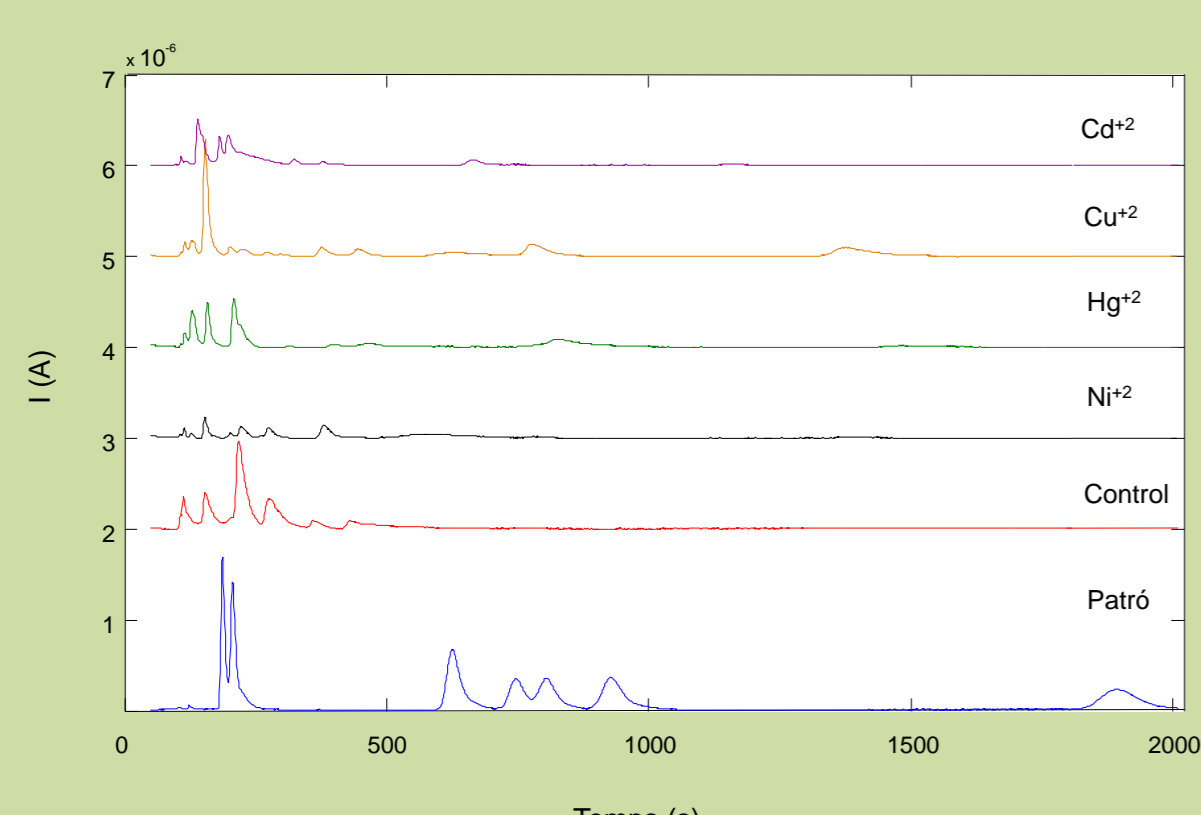
En el gràfic es mostra l'efecte dels diferents nivells de concentració dels metalls en la biomassa dels enciams del cultiu hidropònic comparades amb la seva biomassa inicial i la mostra control.

Patrons cromatogràfics

La quantificació de fitoquelatines i les seves isòformes es va realitzar per calibratge amb recta externa en un interval de concentració de 10 a 100 µmol L⁻¹. En el cromatograma es poden veure els temps de retenció dels 7 patrons quantificats: 1 (glutatió), 2 (γ-glu-cys), 3 (PC₂), 4 (PC₂-glu), 5 (PC₂-ala), 6 (Cys-PC₂), 7 (PC₃) i els cromatogrames dels extractes d'enciams de 4 zones del parc agrari



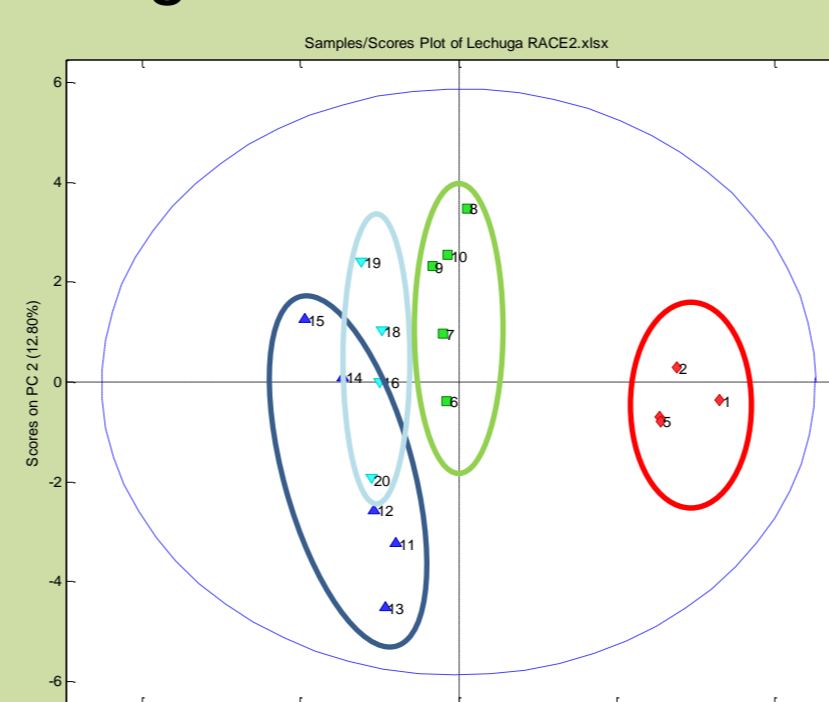
Cromatogrames dels extractes d'enciams del cultiu hidropònic



En el gràfic es representen un patró amb els 7 compostos estudiats i els extractes dels enciams regades amb concentracions de 50 ppm de cada metall i el control.

Tractament quimiomètric.

Es va realitzar un anàlisi de Components Principals als cromatogrames dels extractes d'enciams de les 4 zones del Parc Agrari.



En el gràfic de scores es pot observar la separació de la zona 1 (cultiu de control) de les altres tres zones exposades a diferents fonts de contaminació viària.

Resum

- S'ha detectat la presència de PC₂-ala en la majoria dels enciams analitzats.
- Les mostres de les zones 2 i 4 presenten baixes concentracions de PC₂-ala igual que les mostres dels enciams sotmesos a l'acció de Cd, Cu i Hg.
- Els diferents extractes d'enciams, tant hidropònics com les del parc agrari, presenten una empremta cromatogràfica que permetria una possible classificació.

Reference:

- A. Dago, I. González, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. Journal of Chromatography A, 1409 (015) 210-217
- E. A. Maier, R. D. Matthews, J.A. Mc Dowell, R.R Walden, B. A. Ahner. Journal of Environmental Quality; jul/aug 2003; 32, 4; Health & medical collection.