UNIVERSIDAD NACIONAL "SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO" – HUARAZ

FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN *Schinus molle y Pennisetum clandestinum* QUE CRECEN EN LOS RELAVES DE LA PLANTA CONCENTRADORA "SANTA ROSA" DE JANGAS -HUARAZ, 2009.

Qco. Rosario Barra Zegarra

M. Sc. José Armando Padilla Sobrados

M. Sc Juan Barreto Rodríguez

Huaraz – Perú

2009

RESUMEN

En el presente estudio se utilizó el método comparativo para analizar la relación existente entre la actividad de enzimas oxidantes: Superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), y catalasa (CAT) y la concentración de metales pesados (Cu, Zn, Fe, y Pb) en hojas de *Schinus molle y Pennisetum clandestinum* que crecen sobre los relaves de la Planta de Tratamiento de Minerales "Santa Rosa" de Jangas y en suelos agrícolas no perturbados. La concentración de metales pesados se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y la actividad enzimática por espectrofotometría UV-Vis. Los resultados muestran una respuesta diferenciada del sistema de enzimas antioxidantes de *S. molle* y *P. clandestinum* con respecto al control, se determinó que existe una correlación moderada inversa entre la concentración de Pb y la actividad SOD ($r= -0.73$; $p<0.005$), $R^2 = 0.541$, la correlación con otros metales es mínima, además, *S. molle* y *P. clandestinum* son especies tolerantes al estrés por Pb, Zn y Cu, siendo bioacumuladoras de Fe que hacen de ellas especies promisorias para acciones de fitorremediación futuras.

Palabras Clave: Enzimas antioxidantes, Metales pesados, relaves mineros.

ABSTRACT

In the present study was utilized the comparative method to analyze the relationship between the activity of antioxidative enzymes Superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) and the concentration of heavy metals (Cu, Zn, Fe, and Pb) in leaves of *Schinus molle* and *Pennisetum clandestinum,* growing on the tailings dumps of the Mineral Processing Plant "Santa Rosa" of Jangas and undisturbed agricultural soils. The heavy metal concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAS) and enzymatic activity by UV-Vis spectrophotometry.The results show that there is a differential response of antioxidant enzyme system of *S. molle* and *P. clandestinum*, with regard to control, also it was determined that there is a moderate inverse correlation between Pb concentration and SOD activity ($r = -0.73$, $p < 0.005$), $R2 = 0.541$, correlation with other metals is minimal; in addition, S. molle and P. clandestinum are stress-tolerant species for Pb, Zn and Cu, and are Fe bioaccumulative species, that make them promising for future phytoremediation actions

Key Words: **Antioxidative enzymes, Heavy metals, tailings dumps.**

INTRODUCCIÓN.

Las plantas concentradoras de minerales generan relaves que representan un riesgo potencial para el ambiente. La peligrosidad de las canchas de relaves radica en su contenido de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Pb, Se, Ni entre otros), la disponibilidad de los mismos bajo las condiciones ambientales del lugar y la dispersión del residuo por acción del viento y el agua, originando la contaminación por metales pesados de suelos, cursos de agua, y de la vegetación de los sectores cercanos a las mismas.

De otro lado, los metales pesados tienen una larga vida media y representan graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal (Duffus, 2002), sin embargo, se ha observado que en las inmediaciones y en el propio talud de la presa de relaves de la planta concentradora de minerales "Santa Rosa" de Jangas de la ciudad de Huaraz, crece variada vegetación que ha sido implantada naturalmente o sembrada de manera experimental, y entre la que se encuentran especies como S*chinus molle (*molle*) y Pennisetum clandestinum (kikuyo)* .

Diversas investigaciones (Panda, S. 2008; Ranieri et al. 2001; Caro y Puntarulo, 1996) han demostrado que el exceso de metales pesados tóxicos induce a la formación de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas como el ión superóxido, oxígeno singlete o el peróxido de hidrógeno, originando lo que se conoce con el nombre de estrés oxidativo, entendido como el estado de la célula en la que está alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular producida por la excesiva producción de ROS y /o deficiencia en los mecanismos antioxidantes que pueden causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas (Panda, S. 2008)

Para hacer frente a este estrés oxidativo las células de las plantas poseen un sistema de defensa antioxidante formado por compuestos enzimáticos y no enzimáticos. Entre los compuestos enzimáticos se encuentran las *enzimas antioxidantes* como superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), las mismas que son esenciales para las células aeróbicas, puesto que mantienen dentro de niveles aceptables las concentraciones de ROS.

De otro lado numerosas investigaciones (Panda, S. 2008; Panda y Patra 1997; Chongpraditnum et al. 1992; Gallego et al, 1996 entre otros) han demostrado que

cuando las especies vegetales son sometidas a estrés crónico por metales pesados, muestran cambios en la actividad enzimática (activación o inhibición), disminución o aumento de los compuestos antioxidantes hidrosolubles(glutatión reducido, y ácido ascórbico), y de liposolubles (α-tocoferol, flavonoides, polifenoles, y otros), así como incremento de peroxidación lipídica, y de los niveles de H_2O_2 y de las fosfatasas ácidas.

Sin embargo, no se ha encontrado información sobre el comportamiento del sistema de enzimas antioxidantes de *S. molle y P. clandestinum* sometidos a estrés abiótico producido por metales pesados, ni información sobre su capacidad o potencial bioacumulador de metales pesados, razón por la que resulta importante conocer si las especies vegetales *Schinus molle y Pennisetum clandestinum*, que crecen sobre el relave de la planta concentradora de minerales "Santa Rosa" de Jangas de la ciudad de Huaraz, son bioacumuladoras de metales pesados (Zn, Fe, Pb, y Cu) y si existe una relación entre las concentraciones de éstos metales y el nivel de enzimas antioxidantes (SOD, POD y CAT), a fin de encontrar marcadores de estrés oxidativo y por tanto indicadores de contaminación por metales pesados.

- **Planteamiento Del Problema**

  ¿Cuál es la relación entre la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa y la concentración de cobre hierro, plomo y zinc en hojas de S*chinus molle y Pennisetum clandestinum* que crecen sobre los relaves de la planta concentradora "Santa Rosa" de Jangas de Huaraz?

HIPÓTESIS

Existe una correlación positiva entre la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa y la concentración de cobre, hierro, plomo y zinc en hojas de S*chinus molle y Pennisetum clandestinum* que crecen sobre los relaves de la planta concentradora "Santa Rosa" de Jangas de Huaraz.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes del estudio.

Se han realizado numerosas investigaciones a nivel internacional relacionadas con los efectos del estrés biótico o abiótico sobre el sistema antioxidante de especies vegetales, pero en su mayoría se trata de estudios de carácter experimental realizados en cultivos hidropónicos. Así, Panda y Patra (1997) revelaron cambios significativos en la actividad SOD *en Hidrilla*

verticillata L. bajo condiciones de estrés abiótico por metales pesados, como cromo, zinc, cobre y cadmio, temperatura, salinidad inducida por cloruro de sodio y el estrés hídrico.

En estos estudios la actividad SOD aumentó de manera uniforme en las plantas tratadas con soluciones de Cd y Cu en la medida que aumentaban las concentraciones; sin embargo, en las plantas tratadas con Zn y Cr se observó un decrecimiento uniforme cuando las concentraciones de estos metales aumentaron en el medio, en comparación al control. La disminución en la actividad de esta enzima bajo el tratamiento con Cr y Zn, pudiera estar asociado con la producción de ROS que puede provocar la inactivación de esta enzima (Gallego et al, 1996).

Resultados similares fueron obtenidos por Chongpraditnum et al., (1992), los cuales reportaron una inducción de la actividad de la SOD de raíces de soja, lo cual fue relacionado con incremento en los niveles de radicales superóxido. Sin embargo Gallego et al. (1996) reportaron una disminución de la activadad SOD bajo tratamiento con Cd, mientras que Dixit et al. (2001) encontraron aumentos en la actividad de esta enzima en hojas de *Pisum sativum*.

Panda, S (2008), realizó un estudió experimental sobre el impacto del Cu en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la peroxidación lipídica y la presencia de sustancias antioxidantes en hojas y raíces de *Lemna minor*, encontró que concentraciones tóxicas de Cu, (20, 50, o 100 μM de $CuSO_4$) inducen la formación de ROS como H_2O_2, radical superóxido y radical $OH^{\cdot}$, así como se determinó un alto incremento de la producción de malondialdehido sólo después de 12 y 48 h de tratamiento con Cu. Las actividades de guayacol peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD) disminuyeron después de 48 h, mientras que la actividad de glutatión reductasa aumentó después de 48 h de exposición.

Ranieri et al. (2001) estudiaron la respuesta de ascorbato peroxidasa, (APX), peroxidasa (POD) y el contenido de H_2O_2 en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Hor) producidas hidropónicamente con o sin hierro en la solución nutritiva para verificar si la deficiencia de hierro inducía estrés

oxidativo. En ausencia de Fe se observó un aumento significativo del contenido de H_2O_2, en lo que respecta a la actividad de APX extracelular esta disminuyó significativamente, mientras que no se observaron cambios en la actividad POD. Al nivel intracelular tanto guayacol-POD y APX experimentaron una disminución significativa en su actividad.

Concluye que, en las plantas de girasol, la deficiencia de hierro parece afectar a las diferentes isoenzimas de la peroxidasa en distinta medida, e induce a un estrés oxidativo secundario, como lo indica el aumento de los niveles de H_2O_2. Sin embargo, debido a la falta casi por completo de hierro catalítico capaz de provocar la reacción de Fenton, plantas de girasol deficientes en hierro son probablemente aun suficientemente protegidas contra el estrés oxidativo.

Del análisis de los antecedentes expuestos podemos concluir que, los niveles de actividad enzimática dependen en general de la especie en cuestión y el tipo de metal.

1.2. Sistemas Antioxidantes en las plantas.

Las plantas poseen un sistema antioxidante eficiente que provee de protección a las mismas frente a los daños provocados por las ROS. Este sistema antioxidante puede ser enzimático o no.

El sistema antioxidante enzimático está constituido por un grupo de enzimas que intervienen en la eliminación de las ROS, una posible clasificación de los sistemas enzimáticos que presentan las células vegetales se muestra a continuación (Clijsters y cols. 1999):

Tabla 1. Clasificación de los sistemas enzimáticos según Clijsters y cols. 1999

Enzimas que metabolizan EROs	Peroxidasas (POD) Superóxido dismutasas (SOD) Catalasa (CAT)
Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión	Ascorbato peroxidasa (APX) Monodehidroascorbato reductasa (MDHR) Dehidroascorbato reductasa (DHR) Glutatión reductasa (GR) Enzima málica (ME)
Enzimas reductoras de $NAD(P)^+$	Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa(G6PDH) Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) Glutamato deshidrogenasa (GDH)

- ***Superóxido dismutasa.***

La SOD constituye la primera fase de defensa antioxidante, está presente en casi todos los organismos aerobios. Es una de las enzimas clave en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo ya que actúa sobre los radicales superóxido (O2•-), como se muestra en la siguiente reacción $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Forma una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 y O_2. Esta reacción es 10 000 veces más rápida que la dismutación espontánea del anión superóxido. Esta enzima, elimina el O_2^- y en consecuencia disminuye el riesgo de formación del radical $OH^{\cdot}$ vía reacción de Haber-Weiss.

La SOD se clasifica según el cofactor sea cobre o zinc, hierro y manganeso (Cu/ZnSOD, FeSOD y MnSOD, respectivamente). Normalmente, la MnSOD se localiza en las mitocondrias de todas las células eucariotas, mientras que las Cu/ZnSOD se han encontrado en el citosol, peroxisomas y cloroplastos de las plantas superiores (Blokhina, et al., 2002).

- ***Catalasa (CAT)***

Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2, para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. Con dadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles...) presenta actividad peroxidasa.

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

$ROOH + AH_2 \rightarrow H_2O + ROH + A$

Por lo tanto, el H_2O_2 es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa y otras peroxidasas. Aunque la **catalasa** no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la

respuesta adaptativa de las células. La **catalasa** captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular (King, 1968).

- ***Guayacol peroxidasa (POD)***

Se denomina guayacol peroxidasa, a un conjunto de enzimas presentes en el citosol, la vacuola y la pared celular en las células vegetales que, al igual que la catalasa y la ascorbato peroxidasa, tienen como sustrato al H_2O_2, al cual reducen hasta agua. Tanto esta enzima como la ascorbato peroxidasa son inducidas por la presencia de metales pesados (Asada 1992).

Es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2).

1.3. Metales pesados y actividad enzimática

Los metales pesados son un conjunto de elementos que presentan como característica común su elevada densidad (Duffus, 2002). A pesar de ser un término controvertido, por impreciso, ha sido ampliamente utilizado en la bibliografía científica (Tiller, 1989). Esta denominación tiene connotaciones de contaminación o toxicidad (Duffus, 2002), pero tiene un escaso significado biológico al agrupar elementos con distinto comportamiento (Duffus, 2002).

Así, la esencialidad de algunos metales pesados para las plantas superiores (Cu, Fe, Mn, Zn) es bien conocida, también para animales (Co, Cr, Ni) y seres humanos (Fe, Mn, Ni, Zn, Cu, V, Co y Cr). Sin embargo, la presencia de otros metales pesados (p. ej. Cd o Pb), no esenciales, puede llegar a limitar el crecimiento vegetal y/o ser tóxicos para las plantas, animales y seres humanos (Adriano, 2001). Además, incluso elevadas concentraciones de elementos esenciales pueden causar efectos negativos sobre los seres vivos.

El estrés en las plantas, derivado de un excesivo contenido de metales pesados en los suelos, es mayor que el provocado por la deficiencia de metales pesados. La fitotoxicidad producida por la elevada concentración de metales pesados, que afecta al crecimiento y desarrollo vegetal, es debida tanto a la toxicidad intrínseca de los metales, como al carácter acumulativo de cada

elemento (García y Dorronsoro, 2001). Los efectos negativos en las plantas son diversos.

Algunos de los más destacables son la alteración de las relaciones planta-agua; el incremento de la permeabilidad de las raíces, que las hace menos selectivas para la absorción de elementos desde el medio; la inhibición de la fotosíntesis y respiración; y la modificación de las actividades de algunas enzimas metabólicas (García y Dorronsoro, 2001).

Diversas investigaciones señalan que los niveles de actividad enzimática dependen en general de la especie vegetal y del tipo de metal. Así los experimentos de exposición de plantas frente a diferentes metales pesados durante tiempos prolongados muestran distinto comportamiento en la actividad SOD. En plantas como *Lupinus polyphillus, Glycine max* L y *Pisum sativum* muchos autores han observado incrementos en la actividad SOD luego de 48 h de tratamiento con Zn, Mn, Cu, Al y Pb. Sin embargo otros autores han observado inhibición de la actividad enzimática (Panda y Patra, 1997; Gallego et al., 1996 y Panda, 2008), o que no se observa cambios en la actividad enzimática (Ranieri et al. (2001).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

La planta concentradora de minerales “Santa Rosa de Jangas” se ubica en la margen izquierda del rio Santa a 100 m de la confluencia del riachuelo LLacash, en el paraje Jangas del distrito de Jangas, provincia de Huaraz, departamento de Ancash; a una altitud de 2800 m.s.n.n. Como punto de referencia las coordenadas UTM son las siguientes: 216 050 E y 8 960 950 N. En el anexo Nº 01 figura el plano de ubicación del área de estudio.

La planta concentradora está dedicada a la prestación de servicios a los pequeños productores de la zona procesando minerales polimetálicos sulfurados por métodos de flotación, tiene dos circuitos, obteniéndose concentrados de plomo-plata y zinc. La capacidad nominal de la planta

concentradora es de 50 toneladas por día y cuenta con una subestación eléctrica de 300 Kw, localizada al sur de la planta. (Informe Auditoría, 2009)

La zona tiene una topografía aparente para los propósitos industriales de beneficio, es este caso se trata de una media ladera accesible con terrazas firmes, geomorfológicamente definida por relaves modelados emplazados sobre terrenos cuaternarios de naturaleza coluvio-aluvial y rígida a desniveles de 10 m aproximadamente, físicamente inmersas en una superficies de 2.6 ha, localmente flanqueada por la carretera de acceso al callejón de Huaylas y el cauce del rio Santa a 14 km al norte de la localidad de Huaraz.

La planta produce 1050 ton de concentrados de Pb y Zn al mes, generando sólidos marginales en el orden de 300% de los concentrados tratados. La cancha de relaves se emplaza en una superficie de aproximadamente 1500 m^2 , la misma que se distribuye en 7 cochas, flanqueadas por diques conformados por los gruesos de los sólidos dispuestos que aseguran su adecuado almacenamiento y manejo hidráulico correspondiente. (Tarazona, A., 2005).

Pablo Espinoza T. (2007), en su propuesta de plan ambiental de cierre y abandono de la planta concentradora ha realizado la caracterización de la relavera determinando que está constituida por arena de grano fino de diversas especies mineralógicas , predominando la ganga conformada por silicatos, andesita, pizarras, lutitas y cuarzo. Otro componente importante del relave son los sulfuros metálicos entre los que predomina la pirita, y en menor proporción arsenopirita, esfalerita, galena entre los detectables por simple inspección visual.

El promedio del pH en pasta del material de la presa de relaves es 6,15 el potencial de neutralización (PN) de 20,15 kg $CaCO_3$/TM, una acidez potencial total (PA) de 177,19 kg $CaCO_3$ / TM y el potencial neto de neutralización (PNN): PNN = – 157,04 Kg $CaCO_3$ / TM, que indican que la relavera tiene un alto potencial de generación de ácido. (Espinoza, P. 2 007).

Para el manejo de los relaves los taludes se van cubriendo con una capa de cal y suelo a fin de evitar la exposición directa del relave, así como se mantiene cobertura de agua para minimizar la generación de polvo.

2.2 TIPOY DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

El presente estudio es una investigación pre-experimental de comparación estática. Utilizándose un grupo control para comparar el comportamiento de asimilación de metales pesados (Cu, Pb, Zn y Fe) y la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, POD y CAT) en dos especies de plantas (*S. molle y P. Clandestinum)* que crecen en condiciones de estrés por metales pesados en el tranque de relaves.

El diseño de la investigación sigue el siguiente esquema:

X **O_1**

O_2

2.3 POBLACIÓN O UNIVERSO

Especies vegetales que crecen en el tranque de relaves de la planta concentradora de minerales "Santa Rosa de Jangas" de la UNASAM. Huaraz – Perú.

2.4 UNIDAD DE ANÁLISIS Y MUESTRA

La unidad de análisis está conformada por: la especie forestal nativa *S. molle* y la especie introducida *P. Clandestinum* que crecen en el tranque de relaves de la planta concentradora de minerales "Santa Rosa de Jangas" de la UNASAM. Huaraz – Perú.

2.5 MUESTREO

Se ha utilizado el muestreo no probabilístico, utilizando el método sistémico preferencial, para la selección de la muestra de hojas *S. molle y P. Clandestinum*, habiéndose tomado la muestra de *S. molle* del talud de la relavera, en tanto que la muestra de *P. clandestinum* se tomó de la base del relave. La zona de muestreo está ubicada en la parte norte de la presa de relaves. Para efectos de comparación las muestras control correspondientes fueron tomadas de suelos agrícolas aproximadamente localizados a unos 1000 m de la planta concentradora.

El muestreo de suelos y relaves se realizó basado también en criterios no probabilísticos, de forma dirigida, de los suelos y relaves en los que crecen las

especies vegetales seleccionadas; la profundidad máxima de la toma de muestra de suelos y relave fue la que se recomienda para analizar el contenido de metales pesados en suelos agrícolas 20 - a 30 cm (Barahona & Iriarte (2001).

Se realizó un solo muestreo, a fines del periodo de estiaje (octubre), tanto de las muestras control como de las muestras problema. En el anexo Nº 1, figura la ubicación de la zona de muestreo en la relavera.

2.6 METODOLOGÍA

2.6.1 **Selección de especies vegetales.**

Se realizó la identificación de las especies vegetales que crecen en la presa de relaves, se puso interés, especialmente, en las especies nativas de la región, y que se desarrollan de forma espontanea o que fueron introducidas de manera piloto en la misma. Se identificaron un total de 16 especies que crecen en el talud de la presa de relaves. En los anexos 2 y 3 figuran la relación de especies vegetales que crecen en la relavera y en las proximidades de la presa de relaves de la planta concentradora "Santa Rosa" de Jangas.

En base a los estudios previos realizados por Tarazona, A. (2005) y Espinoza, P. (2007) y al análisis realizado in situ se seleccionaron dos especies: ***Schinus molle y Pennisetum clandestinum*,** por los siguientes criterios:

. Adaptación de las plantas a los lugares de muestreo.

. Abundancia o densidad de plantas en los lugares de muestreo.

. Vitalidad de la planta

2.6.2 **Determinación de características físico-químicas de suelos y relaves**

Se determinaron las siguientes características físico-químicas: pH, y conductividad eléctrica por su influencia en la dinámica de los metales en el suelo. La determinación de estas propiedades se realizó siguiendo los métodos propuestos por el laboratorio de análisis de suelos de la UNASAM.

- pH

El pH se determinó con un pH-metro (Metrohm 744), con electrodo de vidrio y calomelanos, en una suspensión suelo:agua con una relación peso:volumen de 1:2,5.

- Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica medida en el extracto de pasta saturada permitió conocer el nivel de salinidad de los suelos. La pasta saturada se obtuvo realizando una mezcla suelo:agua, en la que todos los poros del suelo estaban saturados de agua sin que apareciese una fase de agua en la superficie del suelo. Una vez obtenida esta mezcla, que equivale a la humedad de saturación del suelo, se extrajo el agua y en ese extracto se midió la conductividad eléctrica con un conductímetro (La Motte CON 5).

2.6.3 Determinación de Metales pesados.

La determinación de la concentración de metales pesados totales en suelos relaves y plantas (Cu, Zn, Pb, Fe) se realizó en la Unidad de Análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

La determinación de metales se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), utilizando el espectrofotómetro de Absorción atómica modelo AA - 6800, marca Shimadzu, siguiendo los métodos oficiales recomendados por la AOAC 975,03 (pág 42). La determinación de Fe, y Zn se realizó por flama según método USAQ – ME-04, en tanto que la determinación de Pb y Cu se realizó por horno de grafito según método USAQ – ME-15.

2.6.4 Determinación de actividad de enzimas antioxidantes

Se realizó con la colaboración del Centro de Investigación en Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), determinándose la actividad de SOD, POD y CAT, la determinación cuantitativa se efectuó

utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Double Bean PC. LABOMED, siguiendo los siguientes pasos:

- Preparación del extracto enzimático.

  Se preparó un extracto acuoso de hojas frescas de las especies en estudio en la proporción 1:40, se centrifugó por 15 minutos a 1500 rpm en centrífuga refrigerada marca Sorvall RC2-B, el líquido sobrenadante fue transferido a un erlemmeyer con tapa de 200 mL previamente esterilizado y colocado en baño de hielo, para ser utilizado como fuente enzimática, manteniéndose en refrigerador a 5°C hasta su utilización respectiva. El análisis enzimático se realizó, siguiendo el método propuesto por Rodés et al.(2006).

  - Determinación de la actividad de la SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

    A 900 µL de la solución preparada mesclando 50 mM de buffer tris acetato y 1 mM de EDTA a pH 8.2, se le añadió 50 µL del extracto enzimático crudo. La reacción se inicio con la adición de 50 µL de pirogalol, se mezcló y se transfirió inmediatamente a la cubeta, se monitoreo el cambio de la absorbancia (A) a 420 nm durante 1 minuto en el espectrofotómetro UV-Vis de doble haz. La diferencia de la A entre el blanco y las muestras que contienen SOD se expresó como el porcentaje de inhibición de auto oxidación o dismutación del ion superóxido. Se definió como una unidad de actividad enzimática la cantidad de SOD por mililitro de la solución muestra que resulta en un 50 % de inhibición. Los resultados fueron expresados como unidades de actividad por mg de extracto dializado por gramo de peso fresco de hojas de *S. molle y P. clandestinum*,

  - Determinación de la actividad de la catalasa (CAT).

    A 50 mM de tampón fosfato de potasio (pH 7,0), y 200 mM de H_2O_2, se añadió el extracto crudo de proteínas que contiene 100 µg de proteína hasta un volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada por la adición de la H_2O_2. La disminución de la absorbancia de H_2O_2 se registró a 240 nm durante 2 minutos

utilizando tampón fosfato de potasio (pH 7,0) como blanco. La actividad de la enzima se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 de 40 $mm^{-1}cm^{-1}$ y a 240 nm. Los resultados se expresaron como unidades de actividad por mg de extracto dializado por gramo de peso fresco de hojas de *S. molle y P. clandestinum*,

- Determinación de la actividad de la peroxidasa (POD)

  El medio de ensayo se preparó mezclando 0,1 M de tampón fosfato de sodio (pH 5,8), 7,2 mM de guayacol, 11,8 mM de H_2O_2, y el extracto enzimático de la planta conteniendo 100 µg de proteínas, en agua destilada (100 µL) hasta un volumen total de 3,0 ml. La reacción fue iniciada por la adición de H_2O_2 midiendo el cambio en la densidad óptica a 470 nm en intervalos de 15 s durante 2 min. El cálculo de la actividad enzimática se realizó utilizando el coeficiente de extinción molar para el polímero del tetraguayacol oxidado (26,6 $mM^{-1}cm^{-1}$). Una unidad de actividad de peroxidasa se definió como el consumo calculado de 1 µmol de H_2O_2 min^{-1} g^{-1} de peso fresco. Los resultados fueron expresados como unidades de actividad por mg de extracto dializado por gramo de peso fresco de hojas de *S. molle y P. clandestinum*.

2.6.5 **Procesamiento y Análisis de datos.**

Los resultados de los contenidos metálicos de las muestras de suelos y plantas fueron utilizados para realizar cálculos del enriquecimiento antropogénico (K_i) y determinación del coeficiente de transferencia (CT) o factor de bioconcentración.

Para calcular el enriquecimiento antropogénico de los metales estudiados en el relave se determinó un coeficiente promedio de enriquecimiento, K_i , por medio de la siguiente fórmula:

$K_i = \frac{[Me]_i}{[Me]_r}$, donde $[Me]_i$ es la concentración promedio del metal en el componente i, en el ecosistema perturbado y $[Me]_r$ es la concentración promedio en el ecosistema de referencia o testigo. (Delgado & Serey, 2002).

Como una forma de estimar las diferencias relativas en bioconcentración de metales pesados se determinó el coeficiente de transferencia o bioconcentración (CT) (Alloway & Ayres, 1997), que se define como la relación entre la concentración en la planta o en un órgano de ella de un elemento determinado y la concentración de ese elemento en el suelo.

Se calculó la actividad relativa del sistema enzimático antioxidante (SOD, CAT Y POD) en hojas de *S. molle y P. clandestinum* expuestas a contaminación por Cu, Fe, Zn y Pb, con respecto a las muestras control

Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación para establecer la relación existente entre la concentración de metales pesados y la actividad de enzimas antioxidantes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características y Propiedades de las muestras de suelos y relaves.

<u>pH</u>

El pH de las muestras de relave tanto del talud como de la base de la relavera es neutro, esto debido al tratamiento con cal que se realiza de los relaves al momento de su disposición final.

El pH de las muestras de suelo control vegetado con *P. clandestinum* es de 6.54 (moderadamente ácido), en tanto que el suelo control vegetado con *S. molle* es 7.69 (moderadamente alcalino). Estos valores se encuentran dentro de los aceptados para suelos agrícolas. En la figura 1 se presentan los valores de pH de las muestras de relaves y suelos control respectivos.

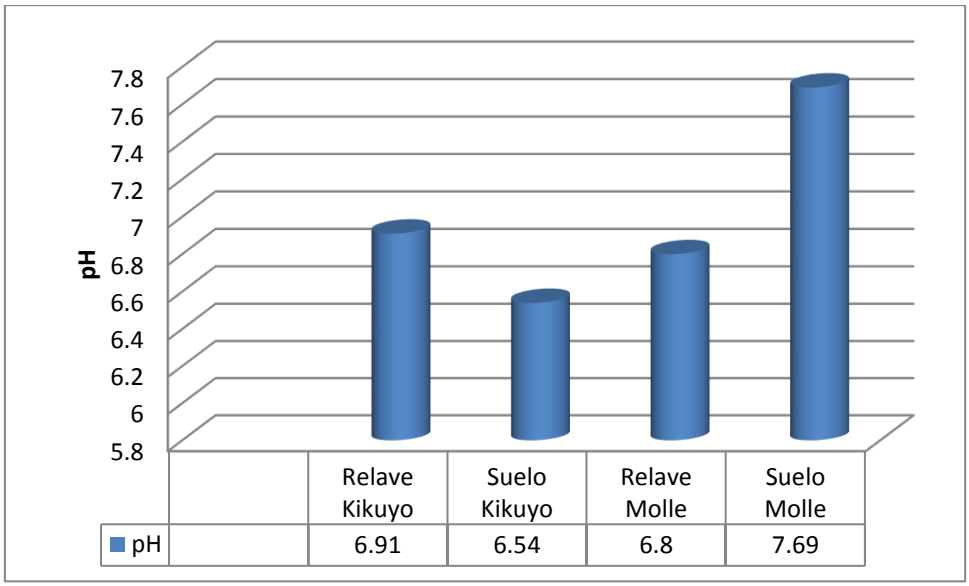


Figura 1.- Valores de pH para relaves y suelos control.

A pesar de la importancia del pH en la adsorción de los metales y, por tanto, en el contenido de los mismos en el suelo, el estrecho rango de valores de pH en las muestras puede dificultar la obtención de relaciones estadísticamente significativas con el contenido de metales pesados en los suelos de estas muestras.

Conductividad eléctrica (CE)

En la Figura 2, se presenta la conductividad eléctrica en el extracto de pasta saturada para cada una de las muestras analizadas. La CE es mayor en las muestras de relave que en los suelos control, lo que indica un mayor contenido de sales disueltas; sin embargo, tanto suelos como relave no presentan problemas de salinidad.

En resumen, en el extracto de saturación las muestras presentan una conductividad eléctrica que va de 0.474 a 1.806 dS/m, que indican que no existen problemas de salinidad en ninguna de las muestras (< 2 dS/m)

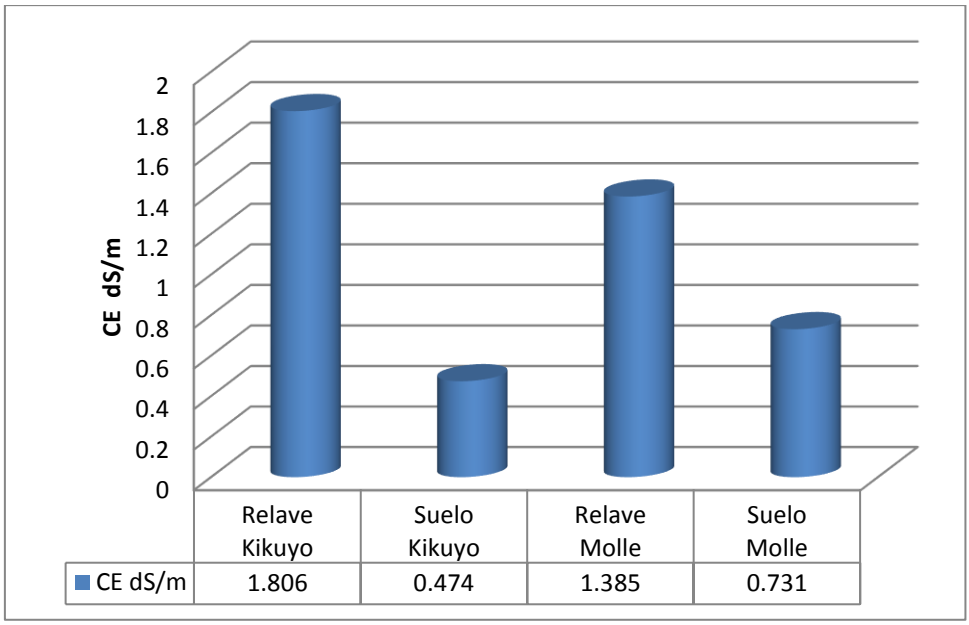


Figura 2.- Conductividad eléctrica (dS/m) en el extracto de pasta saturada de las muestras de relave y suelo control.

La salinidad del suelo puede incrementar, reducir o no tener ningún efecto sobre la concentración de metales en los cultivos. De hecho, los resultados de la relación entre la salinidad y la concentración de los micronutrientes varía en los estudios realizados en función de diversos factores, como el tipo de cultivo, el tejido vegetal, el nivel de salinidad y su composición, la concentración de elementos, las condiciones de crecimiento y la duración del estudio (Grattan y Grieve, 1999).

3.2. Contenido De Metales –Totales en suelos y relave

Los valores obtenidos de metales totales (Cu, Fe, Pb y Zn) en suelos y relave presentan muy distintas órdenes de magnitud, así las concentraciones de Pb, Zn y Cu en el relave superan ampliamente las encontradas en los suelos de referencia. Asimismo, la concentración de Fe total en el relave (13.86 ppm) y en el suelo control vegetado por *P. clandestinum* (11.20 ppm) son casi similares, en tanto que la concentración de Fe en el sustrato de relave vegetado por *S. molle* supera en aproximadamente 3 veces la concentración de Fe en el suelo testigo.

Las concentraciones de Pb y Zn en los relaves superan ampliamente los límites máximos permitidos (LMP) por la legislación internacional para suelos

agrícolas, establecidos en 50 ppm para Pb y 200 ppm para Zn. Si bien es cierto, los relaves no pueden ser considerados suelos, sin embargo en dicho sustrato crecen normalmente tanto *S. molle* como *P. clandestinum.*

Las concentraciones de Pb, Zn, Cu y Fe en la muestra de relave vegetado por *P. clandestinum* son menores que las encontradas para la muestra de relave vegetado *S. molle*, ello se explica por el hecho de que la primera corresponde a relaves situados en la base de la relavera y por ende relaves de mayor antigüedad que han estado sujetos a transformación gradual y a procesos de lixiviación. En tanto que la muestra de relaves vegetada por *S. molle* por haber sido tomada del talud de la relavera corresponde a relaves más frescos, y por ende con mayor contenido metálico total.

La concentración de metales pesados en relaves y suelo control se presenta en la tabla 1, así como los máximos permitidos en suelos agrícolas para la aplicación de enmiendas en suelos con pH<7,0 a nivel de España, según el Real Decreto 1310/1990 del 29 de octubre y los valores aceptados por países, como Holanda, especialmente sensible a este problema.

Tabla 2. Contenido de metales totales, en suelos y relaves (ppm), y comparación con suelos agrícola.

MUESTRA	Pb	Zn	Cu	Fe
Relave *P. clandestinum*	801.15	964.39	13.35	13.86
Suelo *P. clandestinum*	1.15	5.42	nd	11.2
Relave *S. molle*	5821.05	4901.09	523.19	25.43
Suelo *S. molle*	1.47	1.33	nd	8.08
1	50	200	50	
2	50	150	50	

1. LMP. Holanda.
2. España

Se detalla a continuación los resultados de las concentraciones de metales pesados en suelos control y relaves.

Cobre

El Cu es un micronutriente y, como tal, esencial en pequeñas cantidades, siendo deficiente en concentraciones inferiores a 12 ppm (Bradford et al., 1967 citado en White y Zasoski, 1999). Por otro lado, valores mayores a 100 ppm son

superiores al rango considerado como normal por McLean y Bledsoe (1992), y son considerados como fitotóxicos en diversos países. Sin embargo, las concentraciones de Cu en los suelos control parece indicar que hay problemas de Cu, por deficiencia, ya que el contenido de Cu en los mismos es menor a 0,5 (Limite de detección), en tanto que en los relaves supera ampliamente los rangos considerados como normales.

La muestra de relave bajo *P. clandestinum*, tomada de las base de la relavera presenta un contenido de Cu de 13.35 ppm debido probablemente a que en dicho lugar ha tenido lugar la absorción de Cu por las raíces de las plantas y/o quelación por aumento de su bioconcentración, o la lixiviación del mismo.

La concentración de Cu en el talud del relave supera la concentración de 50 ppm, que es la concentración considerada como el valor máximo normal para suelos agrícolas (Adriano, 2001). Lo que es de esperarse ya que el mismo contiene depósitos recientes de relaves.

Hierro

El Fe es un micronutriente esencial para la nutrición vegetal, y no es considerado potencialmente fitotóxico. De hecho, los contenidos de Fe no están incluidos en la legislación que regula la utilización de lodos de depuradoras en el sector agrario para España (BOE, 1990).

El contenido total de Fe en la base del relave es de 13.86 ppm en peso seco, mientras que en el talud es de 25.43 ppm. Estos valores están comprendidos en el rango considerado normal (38.00 ppm) por McLean y Bledsoe (1992), contenidos que son inferiores a la media determinada por estos autores.

Plomo

El Pb es un elemento para el que no se ha descrito ninguna función conocida en los sistemas biológicos. . En suelos agrícolas se ha descrito un amplio rango de concentraciones de Pb, como muestra Adriano (2001) en la descripción de varios estudios realizados en distintas áreas (p. ej. 42 ppm en Inglaterra y Gales; 46 ppm en Ontario; <1 y 12 ppm en Canadá; 25 ppm en Holanda).

En las muestras de suelos agrícolas tomadas como patrón el contenido de Pb es de 1.15 ppm bajo *P. clandestinum* y 1.47 ppm bajo *S. molle*. En tanto que es de

801.15 ppm para la muestra tomada de la base del relave, la misma que es considerablemente menor al contenido de Pb en la muestra de relave del mismo talud, debido a que en este caso se trata de relaves recientes, aunque éste valor es tan elevado (5821.05 ppm), sin embargo el molle crece normalmente se considera que contenidos superiores a 400-500 ppm, producen efectos tóxicos en las plantas (Adriano, 2001).

En relación a éstos valores la EPA (1992) señala como rango normal entre 50 y 100 ppm para suelo superficial, clasificándo por tanto a los relaves como sitios excesivamente fitotóxicos, lo que indica un alto nivel de contaminación por este metal y un problema potencial para los organismos que viven en ese ecosistema.

Zinc

El Zn es un micronutriente necesario a concentraciones de 80 ppm en el suelo, y por debajo de estos niveles es deficiente (Bradford et al., 1967 citado en White y Zasoski, 1999). El contenido de Zn en las muestras de suelo testigo presentan valores insuficientes de Zn, ya que sus concentraciones son inferiores a 80 ppm (5-42 ppm y 1.33 ppm). La deficiencia de Zn en el suelo es común en climas tropicales y templados. (Adriano, 2001).

En tanto que el contenido de Zn en las muestras de relave supera ampliamente los LMP . La EPA (1992), señala como sitios excesivamente fitotóxicos los que contienen entre 200 y 400 ppm de Zn. Los resultados encontrados muestran un contenido de plomo de 964.39 ppm en el relave bajo *P. clandestinum* y de 4901.09 ppm bajo *S. molle*, por lo que el nivel de contaminación debe considerarse como extremadamente alto en el relave (IHOBE, 1998).

Los metales pueden tardar de varias decenas a miles de años en reducir su volumen, ya que no pueden ser degradados; sólo se transforman a otros estados de oxidación en el suelo reduciendo su movilidad y toxicidad (McLean & Bledsoe, 1992).

3.3. Contenido De Metales –Totales en Hojas de *S. molle y P clandestinum*.

En la tabla 3, figuran los resultados del análisis de metales pesados en muestras de hojas de S**.** *molle y P clandestinum*, que crecen en el relave y suelos control, expresadas en ppm en peso seco.

Tabla 3. Contenido de Metales Pesados en hojas de *P. clandestinum* y *S. molle*

MUESTRA	PLOMO (ppm)	ZINC (ppm)	COBRE (ppm)	HIERRO (ppm)
P. clandestinum Relave	156,01	203,05	13,24	302,17
P. clandestinum Testigo	2,16	34,99	11,95	49,59
S. molle Relave	15,99	106,70	9,25	213,41
S. molle Testigo	0,56	9,37	11,67	210,87

Las concentraciones de Pb, Zn y Fe son comparativamente superiores en hojas de *P. clandestinum* que crecen en el relave que en las correspondientes muestra control, el orden de concentración de metales en *P. clandestinum* que crece en el relave es: Fe>Zn>Pb>Cu, mientras que en la muestra control del mismo es Fe>Zn>Cu>Pb. Las concentraciones de Pb, Zn y Fe en hojas de *P. clandestinum* que crecen en el relave superan las concentraciones establecidas en la legislación internacional, en tanto que los contenidos de Pb, Cu y Fe en la muestra control se encuentra dentro de los contenidos normales especificados por Epstein y Bloom (2004), citados en Kirkby y Romheld (2008).

En hojas de *S. molle* que crece en el relave las concentraciones de Pb (15.99 ppm), y Zn (106. 70 ppm) superan ampliamente las concentraciones en la muestra testigo, así como los límites máximos permisibles para plantas establecidos en 5-10 ppm para Pb y 20 ppm para Zn (Alloway y Ayres, 1997). En tanto que la concentración de Cu en hojas de molle testigo (11.67 ppm) supera ligeramente a la concentración de cobre en hojas de molle que crece en el relave (9.25 ppm), encontrándose dichas concentraciones dentro de los contenidos normales para plantas (5-20 ppm) según Adriano (2001).

De otro lado las concentraciones de Fe en hojas de *S. molle* que crece tanto en el relave como molle testigo son casi similares superando ligeramente la concentración de Fe en molle que crece en el relave (213.41 ppm) a la concentración en el control (210.87 ppm), ambas exceden los LMP para plantas establecido en 100 ppm (Epstein y Bloom, 2004).

Las concentraciones de Pb, Zn Cu y Fe en hojas de kikuyo del relave son mayores que las respectivas concentraciones en hojas de molle que crece en el relave.

Las concentraciones de Pb y Zn en las hojas de kikuyo testigo son mayores que en hojas de molle control. En tanto que la concentración de Fe en *S. molle* testigo supera ampliamente (210.87 ppm) a la concentración de Fe en hojas de P. *clandestinum* testigo (49.59 ppm) y las concentraciones de Cu en ambas especies son muy similares para las muestras testigo o control (en molle 11.95 ppm y kikuyo 11.67).

Se analiza a continuación los resultados de las concentraciones de metales pesados en hojas de kikuyo y molle por tipo de metal:

Cobre

El Cu es un elemento esencial para las plantas, y adquiere una función importante en las actividades metabólicas de las plantas superiores. A pesar de ello, se encuentra en menor concentración que otros elementos esenciales. Las plantas se pueden desarrollar con normalidad con pequeñas concentraciones de Cu en los tejidos, concretamente entre 5 y 20 ppm (Adriano, 2001). Los valores inferiores a 4 ppm o superiores a 20 ppm pueden producir problemas en el desarrollo vegetal tanto por deficiencia como por exceso.

Todas las muestras analizadas (kikuyo y molle que crecen en el relave y suelos control) se sitúan entre los contenidos normales de Cu en plantas (5-20 ppm) así: La concentración de Cu, expresada en peso seco, de las muestras (entre 9.25 y 13.24 ppm expresados en ppm de materia seca.) está en el rango definido normal por Adriano (2001), y se encuentran por encima del rango (6 ppm) considerado como normal por otros autores como Epstein y Bloom (2004) aunque no alcanzan valores tóxicos.

Hierro

El Fe es un micronutriente esencial para el desarrollo vegetal, y presenta la mayor concentración de los elementos analizados en este trabajo en los dos tipos de plantas estudiadas. El contenido de Fe en hojas, expresado en peso seco, varía entre 49.59 ppm (*P. clandestinum* testigo) y 302.17 ppm (*P. clandestinum* del relave).

Los contenidos normales de Fe en plantas varían, desde 50 ppm hasta 250 ppm en peso seco, dependiendo de la parte de la planta que se considere y de la especie. Sin embargo, contenidos en plantas por debajo de 50 ppm de Fe pueden indicar problemas de deficiencia en este elemento, que suele manifestarse inicialmente en hojas jóvenes. Las causas que puede motivar esta deficiencia pueden ser, entre otras, las bajas concentraciones de formas asimilables en el suelo, los altos niveles de carbonatos y fosfatos o las interacciones con otros elementos (p. ej., Cu, Mn o Zn).

PLOMO

El contenido de Pb analizado varía entre 0.56 ppm (molle - testigo) y 156.01ppm (*P. clandestinum* - relave). Las muestras control de *S. molle* y *P.clandestinum* se sitúan dentro de los contenidos normales que según Alloway y Ayres (1997) se encuentran entre 5 y 10 ppm. Mientras que las mismas especies que crecen en el relave superan los LMP.

Se observa asimismo que la muestra de *S. molle* que crece en el relave, presenta un contenido de Pb en hojas mucho menor que *P. clandestinum*, a pesar de las altas concentraciones de Pb en el relave (5821.01 ppm en el sustrato seco) Estos resultados parecen reflejar que los niveles tóxicos de Pb analizados en el relave no son mayoritariamente transferidos a la planta, lo que estaría relacionado con la baja disponibilidad del Pb a pH neutro.

ZINC

El contenido de Zn varía entre 9.37 ppm (molle-testigo) y 203.05 ppm (*P. clandestinum* relave), es comparativamente superior en hojas tanto de molle como kikuyo que crecen sobre el relave y exceden los LMP, siendo mayor en hojas de *P. clandestinum* (203.05 pppm) que en *S. molle* (106.7 ppm).

Las muestras control analizadas presentan contenidos normales de Zn, que se sitúan entre 20 y 100 ppm, cabe mencionar también, que dichas muestras presentan un contenido de Zn en hojas superior al contenido total en el suelo. Estos resultados podrían ser debidos a varias causas, por un lado, puede ser debido a la aplicación foliar del Zn sobre los cultivos del área de estudio, o por la forma química en la que se presentan.

Por tanto, la concentración de metales pesados en los cultivos depende de (a) la disponibilidad del elemento en el suelo en función de su origen, así como de las propiedades y características del suelo; (b) la especie y el tipo de planta, puesto que la rizosfera de determinadas especies pueden modificar la dinámica de estos elementos en el suelo y favorecer la absorción; (c) la parte de la planta que se analice (raíces, fruto, hojas o inflorescencia) y el estadio de la misma, es decir, el estado de maduración. En este sentido, las raíces de algunas plantas presentan barreras específicas que impiden la absorción de algunos metales en determinadas condiciones. Por ello, aunque el contenido de metales pesados sea elevado en el suelo, las plantas pueden no absorberlos. Así, por ejemplo, algunos estudios han establecido que el 90% del Pb contenido en hojas de cultivos procede de la absorción foliar (Adriano, 2001).

3.4. **Determinación de enriquecimiento antropogénico (K_i) y coeficiente de transferencia (CT) o factor de bioconcentración de *S. molle y P clandestinum*.**

El enriquecimiento en metales pesados en el relave, estimado a través de los K_i, fue heterogéneo. Los valores más elevados, es decir donde el enriquecimiento es mayor, correspondieron al enriquecimiento por Plomo tanto en *P. clandestinum* donde el K_i es 72.23 como en S. molle donde Ki es 11.39 El menor enriquecimiento correspondió al cobre en *S. molle* (K_i = 0.79) (Figura 3).

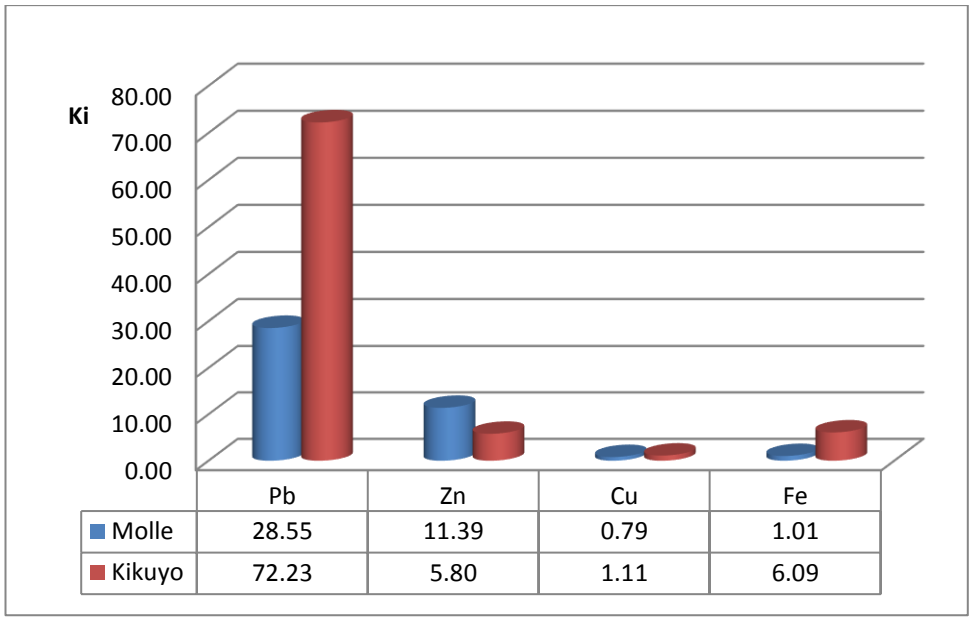
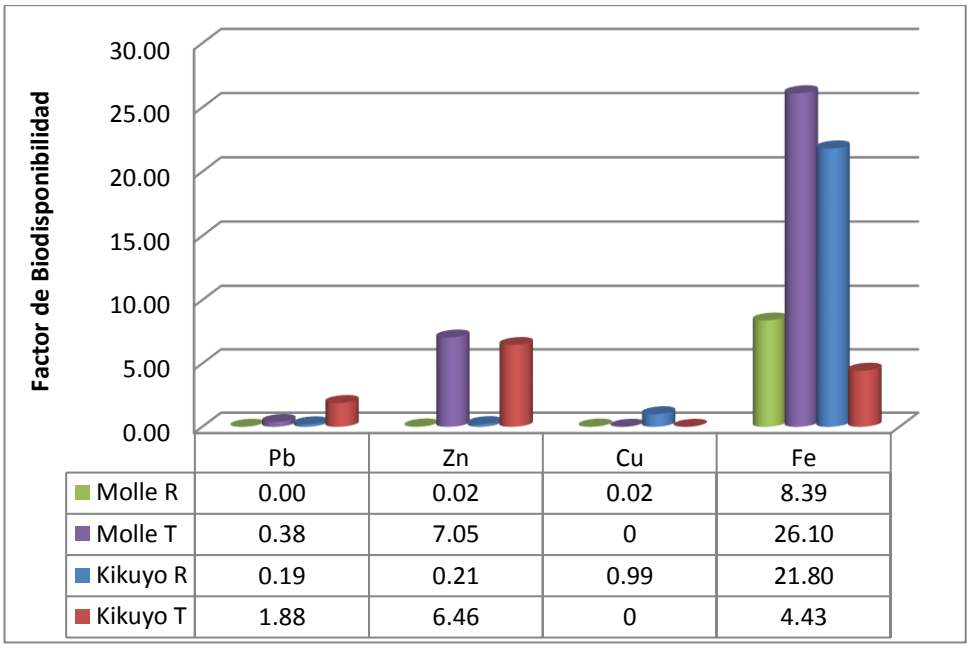


Figura 3. Coeficiente de enriquecimiento (K_i) para hojas de *S. molle y P. clandestinum*

El análisis del coeficiente de transferencia (CT) o factor de bioconcentración, mostró que los mayores valores de CT lo presentan *P. clandestinum* que crece en la base del relave para el Fe (CT = 21.80) y el molle testigo (CT = 26.10), seguido de altos valores de CT para Pb y Zn tanto en *P. clandestinum* como *S. molle* testigos lo que significa que la bioconcentración de Pb y Zn es mayor en los testigos lo cual estaría relacionado con el valor del pH ligeramente más ácido en ambos casos.

CT mayores a la unidad indican un movimiento o translocación de los metales del suelo a la parte aérea de las plantas y por ende son indicativos del carácter bioacumulador o bioextractor de las mismas. En la figura 4 se muestra los resultados de los coeficientes de transferencia para *S. molle y P. clandestinum*.



	Pb	Zn	Cu	Fe
Molle R	0.00	0.02	0.02	8.39
Molle T	0.38	7.05	0	26.10
Kikuyo R	0.19	0.21	0.99	21.80
Kikuyo T	1.88	6.46	0	4.43

Figura 4. Coeficiente de transferencia (CT) o factor de bioconcentración para hojas de *S. molle y P. clandestinum*.

De los resultados expuestos se puede concluir que ambas especies se comportan como bioacumuladoras de Fe, destacando *S. molle* control (CT= 26.10) y *P. clandestinum* (CT = 21.80) que crece en el relave. Destaca aquí molle control que es bioacumulador de Fe, incluso a pH moderadamente alcalino.

Asimismo, tanto *S. molle* como *P. clandestinum* que crecen en condiciones no contaminantes por Zn son naturalmente bioacumuladores de Zn, el CT para *S. molle* es 7.05 y para *P. clandestinum* es 6.46. Así como *P. clandestinum* naturalmente es bioacumulador de Pb el CT es 1.88.

S. molle que crece sobre el relave es bioexclusor de Pb Zn y Cu en las condiciones físico-químicas del sustrato del relave lo que pone de manifiesto la escasa aptitud captadora de molle por éstos metales unido a la baja movilidad y disponibilidad de éstos metales debidas al pH neutro (6.91). Esto significa que *S. molle*, especie forestal nativa de la zona, es una especie tolerante a altas concentraciones de Pb. Zn y Cu en el relave y puede muy bien ser utilizada como planta forestal en acciones de estabilización de relaves.

Las mayores concentraciones de Pb, Zn, Cu y Fe encontradas en hojas de *P. clandestinum* y los mayores valores de los factores de bioconcentración hallados

para Pb, Zn y Cu, permiten establecer que *P. clandestinum*, especie introducida que crece de manera espontánea en el relave, tiene mayor capacidad de acumular cantidades significativas de éstos metales, sin llegar a ser una especie hiperacumuladora, es una especie prometedora para ser considerada en posibles acciones de fitorremediación.

En consecuencia, las altas concentraciones de Pb, Zn y Fe en hojas de *P. clandestinum* que crece en las base del relave así como la dominancia de esta especie en la zona de estudio, sugieren también que esta especie debe poseer mecanismos de detoxificación los cuales deberían de estudiarse.

El contenido de metales en los cultivos depende de una gran variedad de factores. De todos ellos, hay que destacar la especie vegetal, el tipo de suelo y sus características físico-químicas, y las condiciones climáticas (Hooda et al., 1997), ya que influyen tanto en la toma de los metales por la planta como en su distribución entre los diferentes órganos vegetales.

3.5. Actividad de Enzimas antioxidantes

En la tabla 4 figuran los resultados comparativos de la actividad total de enzimas antioxidantes, expresadas como unidades de actividad por mg de extracto dializado por gramo de peso fresco de hojas de *S. molle y P. clandestinum*, que muestran que la actividad de superóxido dismutasa (SOD) supera la actividad de catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) en hojas de *P. clandestinum y S. molle* .

Tabla 4: Cuadro comparativo de la Actividad de enzimas antioxidantes (Ux mg dial/ghfresc).

MUESTRA	SOD x 10^2	Catalasa	Peroxidasa
P. Clandestinum Relave	3.20	2.49	7.067
P. Clandestinum Testigo	4.96	3.11	9.252
Molle Relave	8.67	0.30	0.449
Molle Testigo	9.36	n.d	0.449

Asimismo, el orden de actividad enzimática para *P. clandestinum* y *S. molle* es como sigue: SOD>>POD>CAT, ello se explica por el hecho de que SOD es la enzima de primera línea que actúa frente a las ROS, transformando el ion superóxido(O_2^-) a H_2O_2 el mismo que es descompuesto respectivamente por POD y CAT a O_2 y H_2O, por lo que la actividad de POD y CAT se complementan con la de SOD, eliminando el producto tóxico producido por ésta, se observa que la actividad de CAT es menor ya que ésta última solo actúa en el caso de elevadas concentraciones de H_2O_2, cabe señalar que CAT tiene gran reactividad, pero baja afinidad por el sustrato.

En la tabla 5, se presenta la actividad relativa del sistema enzimático antioxidante (SOD, CAT Y POD) en hojas de *S. molle y P. clandestinum* expuestas a contaminación por Cu, Fe, Zn y Pb, con respecto a las muestras control. Las actividades enzimáticas de los controles fueron tomadas como 100%. Cuando no fue posible determinar la actividad enzimática relativa se representó por (+) el incremento de la actividad con respecto al control.

Nuestro trabajo muestra un efecto concertado de las enzimas antioxidantes SOD CAT y POD, dado por un decremento simultáneo (inhibición) de sus actividades enzimáticas en *P. clandestinum* sometido a estrés por metales pesados, en comparación con *P. clandestinum* control

Tabla 5. Actividad Enzimática relativa (%)

Enzima	Especie	Actividad Enzimática Relativa (%).
SOD	*P. clandestinum*	-35.35%
	S. molle	-7.35%
POD	*P. clandestinum*	-23.62%
	S. molle	0%
CAT	*P. clandestinum*	-19.94%
	S. molle	(+)

El estrés abiótico por metales pesados produjo asimismo, un decremento o inactivación de la actividad enzimática de POD en un 23.62%, y de CAT a un menor nivel (19.94%), en *P. clandestinum* comparada con el control lo que indicaría, una disminución de las actividades de las enzimas eliminadoras de ROS, que tiene como componente o cofactor al Zn, Cu, y Fe. En tanto que la actividad de SOD en *P. clandestinum* que crece bajo condiciones de contaminación por Pb y Zn fue comparativamente menor en un 35.35% que en *P. clandestinum* control.

En *S. molle* por el contrario, no se observa este efecto concertado del sistema enzimático antioxidante de esta especie. Sólo en el caso de SOD se advierte una inhibición de la actividad enzimática de SOD en molle que crece en condiciones de contaminación por Pb, Zn y Cu con respecto al control de un 7.35%. De otro lado no se observó variación alguna en la actividad de POD en *S. molle* que crece en condiciones de estrés por metales pesados y molle control, en tanto que la actividad de CAT fue mínima y en el control no se pudo determinar o fue nula.

Se advierte que la disminución de la actividad enzimática antioxidante en relación al control fue mayor en *P. clandestinum* que en *S. molle*, lo cual está relacionado con un incremento del contenido de metales pesados (Cu, Fe, Pb y Zn) en hojas de *P. clandestinum* que en *S. molle*.

Existe una amplia evidencia que la exposición de las plantas a un exceso de concentración de metales pesados relacionados con la actividad redox como Fe, y Cu resulta en daño oxidativo (Gallego et al., 1996). La habilidad de las plantas de incrementar la protección antioxidante para combatir las consecuencias negativas del estrés por metales pesados parece estar limitada desde que muchos estudios mostraron que la exposición a elevadas concentraciones de metales reactivos redox resultó en el decremento y no en el incremento de las actividades de las enzimas antioxidantes. Así por ejemplo el crecimiento con exceso de Fe resultó en el incremento de ion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y la producción de OH^- (Caro y Puntarulo, 1996).

De otro lado la autooxidación y la Reacción de Fenton pueden causar la perdida oxidativa de la defensa enzimática. Por ejemplo, la actividad de la CAT es directamente inhibida por el ion superóxido. Asimismo, la Cu-Zn SOD es fragmentada por los radicales OH^-, Casano et al, (1997) y Clijsters et al. (1999) han

demostrado que Pb inactiva numerosas enzimas por formación de enlaces con grupos GSH, la inhibición del 50% de la mayoría de enzimas se produce a una concentración de entre 10^{-5} y 2.10^{-4} M de plomo, la inhibición sobre la actividad enzimática es causada por la interacción de Pb con los grupos -SH que están presentes en el centro activo de las enzimas, los cuales son esenciales para la estabilización de su estructura terciaria.

De otro lado reportes previos presentados anteriormente han mostrado una respuesta variada de un incremento o decremento en la actividad de SOD en plantas expuestas a diferentes metales. La reducción en la actividad de SOD en plantas tratadas con metales ha sido atribuida a una inactivación de la enzima por el H_2O_2 que es producido en diferentes compartimentos celulares donde SOD cataliza la reacción de dismutación de los radicales superóxido. El H_2O_2 también puede ser producido por un número de procesos enzimáticos y no enzimáticos en las células. Mientras las mitocondrias y los cloroplastos son la mayor fuente de H_2O_2 en las células, peroxisomas y glioxisomas también contienen SOD tanto como ascorbato peroxidasa (APX) las cuales son responsables por la producción de H_2O_2 y su remoción (Jimenez et al., 1997).

La exposición a metales pesados provoca respuestas pronunciadas de los sistemas antioxidantes pero la dirección de la respuesta es dependiente de la especie de planta, y del tejido analizado, del metal usado en el tratamiento. Nuestra investigación demuestra que existe una relación inversa entre el contenido de Pb, Zn y Fe y la actividad enzimática de SOD, CAT y POD en hojas de *S. molle y P. clandestinum* que crecen en condiciones de stress por dichos metales, en consecuencia no se confirma la hipótesis propuesta, por lo que se hace necesario continuar la investigación considerando un mayor número de muestras y ampliando la investigación a otros mecanismos de defensa antioxidante.

3.6. Relación entre Actividad de Enzimas antioxidantes y Concentración de Metales Pesados en Hojas de *Schinus molle y Pennisetum clandestinum.*

Se ha determinado la relación existente entre la concentración de Pb, Cu, Fe y Zn en hojas de *S. molle y P. clandestinum* y la actividad de las enzimas oxidantes (SOD, CAT y POD), los resultados muestran que existe una

correlación moderada inversa entre la concentración de Pb y la actividad SOD (r= -0.73), R^2 = 0.541, por tanto la concentración de Pb predice en un54.1% de los casos la inhibición de la actividad de SOD.

Se observa asimismo una correlación directa mínima entre las concentraciones de Pb, Fe y Zn en hojas de *S. molle y P. clandestinum* y la actividad de CAT y POD, mientras que sólo existe una mínima correlación inversa entre las concentraciones de Fe y Zn con la actividad de SOD y CAT.

De otro lado se ha encontrado una correlación moderada directa entre la concentración de Cu y la actividad de de las enzimas SOD y POD en hojas de *S. molle y P. clandestinum.*

En la tabla 6 figuran los valores del coeficiente de determinación correspondientes (R^2).

Tabla 5. Relación entre la concentración de Pb, Cu, Fe y Zn y actividad de SOD,CAT Y POD en hojas de *P. clandestinum y S. molle*

METAL	**Valores del coeficiente de determinación (R^2)**		
	SOD	**CAT**	**POD**
Pb	0.541	0.16	0.13
Fe	0.02	0.125	0.150
Cu	0.54	0.396	0.44
Zn	0.394	0.164	0.058

Ha sido observado en algunos estudios que la actividad de las enzimas tiene una relación directa con el incremento de las concentraciones de metales pesados. En tanto que otros estudios demuestran lo contrario, en todo caso concluimos como resultado de nuestra investigación que el comportamiento de la actividad enzimática es diferenciado y depende de la especie vegetal.

4. CONCLUSIONES

Existe una correlación moderada inversa entre la concentración de Pb y la actividad SOD ($r= -0.73$, $p<0.05$), $R^2 = 0.541$. La correlación con otros metales es mínima.

Existe una respuesta diferenciada del sistema de enzimas antioxidantes de *S. molle* y *P. clandestinum*, observándose una mayor actividad enzimática de CAT y POD en *P. clandestinum* que en *S. molle.* En tanto que la actividad de SOD es mayor en *S. molle.*

El estrés por Pb, Zn y Fe inhibe la actividad de las enzimas SOD (35.35%), CAT (19.94%) y POD (23.62%) en *Pennisetum clandestinum* que crece sobre el relave con relación al control, mientras que en *S. molle* la variación de la actividad enzimática antioxidante no es tan pronunciada SOD (inhibición 7.35%) o no se observa variación (POD).

La inhibición concertada de las enzimas SOD, CAT y POD en *P. clandestinum* que crece sobre el relave de la planta concentradora "Santa Rosa de Jangas" podría ser considerada como marcador bioquímico de contaminación por Pb, Zn y Cu.

S. molle y P. clandestinum podrían ser consideradas plantas pseudometalofitas ya que resisten, toleran y sobreviven en sustratos altamente contaminados por Pb, Zn y Cu por lo que son especies promisorias a ser considerada en acciones futuras de fitorremediación de los relaves de la planta concentradora Santa Rosa de Jangas.

Tanto *S. molle* como *P. clandestinum* son bioacumuladoras de Fe (CT>1).

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda efectuar estudios ampliatorios a fin de determinar otros marcadores de estrés oxidativo como: determinación de malondialdehido y de especies antioxidantes no enzimáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, D. (2001). *Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemestry, bioavailability and risks of metals.* Nueva York: Springer-Verlag.

ALLOWAY B. J. AND AYRES. (1997). *Chemical Principles of Environmental Pollution* (Segunda ed.). Chapman and Hall.

ASADA, K. . (1992). Ascorbate peroxidase- a hidrogen peroxide scavening enzime in plants. *Physiology Plant , 85,* 235-241.

BARAHONA, E.; IRIARTE, A. (2001). An overview of the present state of standardization of soil sampling in Spain. *The Science of the Total Environment , 264,* 169-174.

BLOKHINA, O.B., VIROLAINEN, E.& FAGERSTEDT , KV. (2002). Antioxidantes, Oxidative damage and Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany , 91,* 179-194.

BOE. (1990). *Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la Utilización de los Lodos de Depuración en el Sector Agrario.* Madrid.

CARO, A AND PUNTARULO, S. (1996). Effect of in vivo iron supplementation on oxigen radical production by soybean roots. *Biochimica et Biophisica , Acta 1291,* 245-251.

CASANO LM, GOMEZ LD, LASCANO HR, GONZALES CA, TRIPPI VS. (1997). Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxigen species in wheat chloroplasts exposed to photo oxidative stress. *Plant and Cell Physiology , 38,* 433-440.

CHONGPRADITNUM, P., MORI,S & CHINO, M. (1992). Excess copper induce a cytosolic Ce, Zn, superoxide dismutase in soybean root. *Plant Cell Phisiology , 33,* 239-244.

CLIJSTERS H, CUYPERS A, VANGRONSVELD J . (1999). Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Journal of Bioscience , 54,* 730-734.

DELGADO L Y SEREY, I. (2002). Distribución del cobre en ecosistemas forestales de tipo mediterraneo. *Revista Chilena de Historia Natural , 75* (l), 557-565.

DIXIT,V., PNADLEY,V. & SHYAM,R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (Pisum sativum L.). *J. Experimental Botany , 52,* 1101-1109.

DUFFUS, J. (2002). "Heavy metals"- a meaningless term? .*Pure Appl.Chem. , 74,* 793-807.

EPA. (1992). *Guide to site and soil description for hazardous waste site haracterization* (Vol. 1:metals).

ESPINOZA, P. (2007). Propuesta de plan ambiental de cierre y abandono de la planta concentradora "Santa Rosa" de Jangas UNASAM. *Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias e Ingeniería* . Huaraz.

GALLEGO, S.M., BENAVIDES,M.P., & TOMARO, M.L. (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science , 121*, 151-159.

GALLEGO, SM, BENAVIDES, MP, TOMARO, ML. . ,. (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science , 121*, 151-159.

GARCÍA I. & DORRONSORO C. (2002). *Contaminación por metales pesados. Departamento de edafología y química agrícola de España.* Recuperado el 12 de noviembre de 2009, de http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/06/pdf%2006/06-003/posterredbio2ki.pdf

GRATTAN, S.R.; GRIEVE,C. M. (1999). Salinity—mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae , 78*, 127-157.

HOODA, P., MCNULTY, D., ALLOWAY, B., & AITKEN, M. ,. (1997). Plant availability of heavy metals in soils previously amended with heavy applications of sewage sludge. *J. Sci. Food Agric , 73* (446-454).

IHOBE. (1998). *Seguridad pública de gestión ambiental). Manual práctico para la investigación de la contaminación del suelo. Seguridad pública de gestión ambiental.* Gobierno Vasco, España.

JIMENEZ A, HERNANDEZ JA, DEL RIO LA, SEVILLA F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology , 114*, 275-284.

KING, J. (1968). *Enzimología Clínica Practica* (Segunda ed.). Zaragoza: Acribia.

KIRKBY, E y ROMHELD, V. (2008). Micronutrientes en la fisiología de las plantas: Funciones, Absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas*, IPNI, nº 8, 1-7.

MCLEAN, J. E. AND BLEDSOE, B. E. (1992). Behavior of metals in soils. *EPA/540/S-92/018* , 1-25.

PANDA, S. & PATRA, H. (1997). Phisiology of crhomium toxicity in plants- a review. *Plant Phisiology Biochem , 24*, 10-17.

PANDA, S. (2008). Impact of copper on reactive oxigen species, lipid peroxidation and antioxidants in Lemna minor. *Biologia Plantarum , 52* (3), 561-564.

RANIERI A, CASTAGNA A, BALADAN B, & SOLDATINI G. (2001). Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany , 52* (354), 25-35.

RODÉS R, REDES, R Y COLLAZO M. (2006). *Manual de prácticas de fotosíntesis.* México: UNAM.

ROSS, S. (1994). Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. En J. Wiley, *Toxic metals in soil-plant systems.* Chischester.

TARAZONA, A. (2005). Uso de indicadores ambientales para evaluar la fragilidad de la zona inmersa en la planta de tratamiento "Santa Rosa" de Jangas. *Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias e Ingeniería, con mención en gestión ambiental.*

TILLER, K. ,. (1989). Heavy metals in soils and their environmental significance. Advances in soil science. *9*, 113-142.

UNASAM. (2009). *Informe de auditoría del sistema de gestión de la planta concentradora de minerales "Santa Rosa de Jangas".* Huaraz.

WHITE, J.G.; ZASOSKI, R.J. . (1999). Mapping soil micronutrients. *Field Crops Research , 60*, 11-26.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO N° 2 Especies en orden de densidad implantadas en el relave

ORDEN DE DENSIDAD	Nombre Común	Nombre Científico	Observaciones
1	P. clandestinum*	*Pennisetum clandestinum*	Implantación natural y crece sobre el relave
2	Campanilla	*Ipomoea sp.*	Implantación natural y crece sobre el relave
3	Cardo		Implantación natural y crece sobre el relave
4	Diente de león	*Taraxacum officinale*	Implantación natural y crece sobre el relave
5	Estragón	*Artemisia dracunculus L.*	Implantación natural y crece sobre el relave
6	Garbancillo	*Astragalus lusitanicus* Lam	Implantación natural y crece sobre el relave
7	Marco	*Ambrosia arborescens*.	Implantación natural y crece sobre el relave
8	Moradilla	*Amaranthus porrigens*	Implantación natural y crece sobre el relave
9	Ñahui pashta	*Solanun Hispidum*	Crece cerca y sobre el talud del relave
10	Ocsha	*Festuca sp.*	Implantación natural y crece sobre el relave
11	Palo bobo	*Tessaria integrifolia*	Implantación natural y crece sobre el relave
12	Raigras	*Lolium sp*	Implantación natural y crece sobre el relave
13	Molle	*Schinus molle*	Plantado y crece próximo y sobre el relave
14	Yerbasanta	*Cestrum auriculatum*	Implantación natural y crece cerca y sobre el talud del relave
15	Yuyo	*Brassica rapa campestris L.*	Implantación natural y crece cerca y sobre el talud del relave
16	Chamico	*Datura stramonium L.*	Implantación natural y crece cerca y sobre el talud del relave

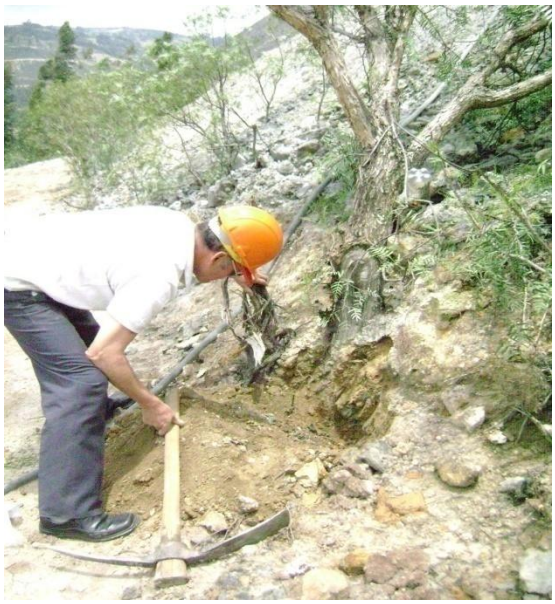
* peremne

ANEXO N° 3 Especies implantadas en las inmediaciones de la relavera

ORDEN DE DENSIDAD	Nombre Común	Nombre Científico	observaciones
1	Alfalfa	*Medicago sativa*	Implantación natural y crece próximo al relave
2	Alfalfilla de flor amarilla	*Melilotus indicus L.*	Implantación natural y crece próximo al relave
3	Capulí	*Prunus serotina*	Implantación natural y crece próximo al relave
4	Chilco	*Baccharis salicifolia*	Implantación natural y crece próximo al relave
5	Congona	*Peperonia sp.*	Implantación natural y crece próximo al relave
6	Espadilla	*Baccharis genistelloides*	Implantación natural y crece próximo al relave
7	Amor seco o Shillco	*Bidens andícola Kunth*	Implantación natural y crece próximo al relave
8	Molle	*Schinus molle*	Implantación natural y crece próximo al relave
9	Mullaca		Implantación natural y crece próximo al relave
10	Musgo	*Sphagnun sp*	Implantación natural y crece próximo al relave
11	Paico	*chenopodium ambrosioides L*	Implantación natural y crece próximo al relave
12	Retama	*spartium junceum*	Plantado y crece próximo al relave
13	Santa lucía	*n.d*	Implantación natural y crece próximo al relave
14	Shoclla	*Brachypodium sp*	Plantado y crece próximo al relave
15	Trebol blanco	*Trifolium amabile Kunth*	Implantación natural y crece próximo al relave
16	Verbena	*Verbena sp*	implantación natural y crece próximo al relave

ANEXO 4

PANEL FOTOGRÁFICO



Fotografía 1. Toma de muestras de relave

Bajo *S. molle*.

Fotografía 2. Toma de muestras de S. molle, que crece en el talud del relave

Fotografía 3.Vista del talud del relave zona norte.

Fotografía 4. *Schinus molle* en época de lluvias que crece sobre el relave.