

## Caracterización de tres bioindicadores de contaminación por metales pesados

### Characterization of three bioindicators of pollution by heavy metals

MSc. Juan J. Piña Leyte-Vidal <sup>1\*</sup>

Est. Lázaro Adrián González-Fernández <sup>2</sup>

Lic. Onibag Gutiérrez-Artilles <sup>2</sup>

MSc. Lázaro Márquez-Llauger <sup>3</sup>

Lic. Tania Alfonso-Del Cristo <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, División de Geociencias Aplicadas, México.

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Parque Nacional Península de Guanahacabibes, Cuba.

<sup>4</sup>Departamento de Caracterización de Materiales (DCM), Centro de Investigación para la Industria Minero Metalúrgica (CIPIIMM), Cuba.

\*Autor para la correspondencia. correo electrónico: [juanplv@fq.uh.cu](mailto:juanplv@fq.uh.cu)

#### RESUMEN

El incremento del turismo en la costa sur de la Península de Guanahacabibes causa preocupación por su posible impacto negativo sobre este ecosistema marino. En esta zona es común la presencia de las especies *Syringodium filiforme*, *Thalassia testudinum* y *Sargassum buxifolium*, reconocidas como bioindicadores de contaminación por metales pesados. En este trabajo fueron caracterizados estos bioindicadores previo a su empleo en estudios de sorción. La caracterización incluyó análisis por Microscopía Electrónica de Barrido con Energía Dispersiva de Rayos X, Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, Espectrometría Óptica de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente, entre otros. Los resultados obtenidos muestran las potencialidades de estos biomateriales para la bioacumulación de metales pesados. Además, con la caracterización fue posible establecer comparaciones entre los tres bioindicadores, así como seleccionar y respaldar algunos de los posibles mecanismos de unión de los metales pesados a la biomasa.

**Palabras clave:** Península de Guanahacabibes, *Syringodium filiforme*, *Thalassia testudinum*, *Sargassum buxifolium*, caracterización.

## ABSTRACT

The increase in tourism on the southern coast of the Guanahacabibes Peninsula causes concern about its possible negative impact on this marine ecosystem. In this zone, the presence of the species *Syringodium filiforme*, *Thalassia testudinum* and *Sargassum buxifolium*, recognized, as bioindicators of contamination by heavy metals is common. In this work, these bioindicators were characterized prior to their use in sorption studies. The characterization included analysis by Scanning Electron Microscopy with Dispersive Energy of X-Rays, Infrared Spectroscopy by Fourier Transform, Optical Spectrometry of Emission with Inductively Coupled Plasma, among others. The results obtained show the potential of these biomaterials for the bioaccumulation of heavy metals. In addition, with the results of the characterization, it was possible to establish comparisons between the three bioindicators, as well as to select and support some of the possible mechanisms of binding of heavy metals to biomass.

**Keywords:** Guanahacabibes, *Syringodium filiforme*, *Thalassia testudinum*, *Sargassum buxifolium*, characterization.

Recibido: 6/3/2018

Aprobado: 11/2/2019

## Introducción

El Parque Nacional Guanahacabibes constituye la zona núcleo de la reserva de la biosfera Península de Guanahacabibes y ocupa 39 830 ha del extremo más occidental del archipiélago cubano, incluyendo 15 950 ha de territorio marino del litoral sur de la península. El mayor tesoro de parque nacional se encuentra oculto bajo sus aguas y se trata de arrecifes coralinos impresionantes, no solo por su arquitectura, sino también por la diversidad de las formas de vida que involucran. En adición, las playas del parque sirven como sitio de desove a tres especies de tortugas marinas.<sup>(1,2)</sup>

En los últimos años se ha incrementado la actividad turística en la región, respondiendo a la estrategia de aprovechar la riqueza natural existente en beneficio económico del país. Sin embargo, este hecho causa preocupación entre las autoridades del parque debido al posible impacto ambiental negativo de esta actividad sobre los ecosistemas marinos de la región. Es conocido que entre los principales indicadores de la posible contaminación de origen antropogénico en la región aparece el aumento de los niveles de metales pesados por encima de los límites permisibles en este tipo de cuerpo de agua.<sup>(3)</sup>

La contaminación de los cuerpos de agua por metales pesados es uno de los principales problemas ambientales. Industrias como la minera, la fundición de metales, la producción de combustible y energía a partir del petróleo, la industria de fertilizantes y pesticidas y sus aplicaciones, entre otras, producen residuos que contienen metales pesados y estos terminan transfiriéndose al medio ambiente acuático, debido a un incorrecto tratamiento o disposición final. Cuando los metales pesados aparecen en los diferentes ecosistemas a concentraciones superiores a los niveles permisibles, poseen importantes efectos tóxicos sobre las células, alterando principalmente el adecuado funcionamiento de las proteínas o provocando su desnaturalización. En adición, estos metales pueden ser bioacumulados y biomagnificados a lo largo de la cadena trófica, en dependencia de las condiciones y características específicas del cuerpo de agua, trayendo graves consecuencias ambientales para el ecosistema marino y la salud del hombre.<sup>(4)</sup>

Los bioindicadores constituyen un gran grupo de especies vegetales, hongos o animales, cuya presencia o estado en un ecosistema determinado brinda información sobre ciertas características ecológicas de este o el posible impacto ambiental de ciertas prácticas sobre el mismo. Estos se utilizan principalmente para la evaluación de la calidad ambiental de los ecosistemas. Todos los bioindicadores deben cumplir una serie de requisitos para su empleo, tales como: dispersión y abundancia en el territorio, sedentarismo y tolerar los agentes contaminantes en concentraciones similares a las del ecosistema contaminado sin efectos letales.<sup>(5,6)</sup>

Entre las especies de pastos marinos más comunes en la costa sur de la Península de Guanahacabibes aparecen *Syringodium filiforme* y *Thalassia testudinum*.<sup>(2)</sup> Además, a esta zona llegan, provenientes de los mares circundantes, grandes cantidades de una especie de alga parda, *Sargassum buxifolium*. Estas tres especies constituyen reconocidos bioindicadores de la contaminación por metales pesados, debido a que combinan la capacidad de biosorber estos metales con las características fundamentales de los bioindicadores.<sup>(7-10)</sup>

La biosorción de metales pesados en algas y pastos marinos se atribuye principalmente a las propiedades de la pared celular, donde, tanto la atracción electrostática, como la formación de compuestos complejos, pueden desempeñar un papel esencial. Las paredes celulares de algas y pastos marinos se componen típicamente de un esqueleto fibrilar y una matriz amorfa. La mayor parte del esqueleto fibrilar se compone de celulosa y la matriz amorfa está predominantemente formada por el ácido algínico o su sal (alginato) y una cantidad menor de polisacáridos sulfatados (fucoidan).<sup>(11-14)</sup> En consecuencia, los grupos carboxílicos son en general los más abundantes en la pared celular de estos biosorbentes. El segundo grupo funcional ácido más abundante es el ácido sulfónico presente en el fucoidan, que normalmente desempeña un papel secundario, excepto cuando la unión al metal se lleva a cabo a un pH bajo. También están presentes los grupos hidroxilo de los polisacáridos, pero son menos abundantes y solo se cargan negativamente a pH superiores a 10 unidades, por lo que igualmente juegan un papel secundario.<sup>(12,15)</sup>

Todo lo anterior justifica la hipótesis de utilizar los bioindicadores anteriores en estudios de la calidad ambiental del ecosistema marino ubicado en la costa sur de la Península de Guanahacabibes ante una posible contaminación antropogénica por metales pesados.<sup>(16)</sup> Sin embargo, como paso previo a estos estudios, se necesita de una completa caracterización de dichos bioindicadores. Balbín *et al.*<sup>(17)</sup> llevaron a cabo la determinación de metales pesados en este ecosistema utilizando *Sargassum buxifolium*, pero no se reportan resultados para los otros dos bioindicadores propuestos. El objetivo del presente trabajo es precisamente caracterizar los bioindicadores *Sargassum buxifolium*, *Syringodium filiforme* y *Thalassia testudinum*, colectados en Playa Antonio, costa sur de la Península de Guanahacabibes.

## Materiales y métodos

### Colecta de los bioindicadores

La colecta y selección de las especies *Sargassum buxifolium*, *Syringodium filiforme* y *Thalassia testudinum* se llevó a cabo a partir de la biomasa algal arribante a Playa Antonio (Punto medio: 21°55'11" latitud norte y 84°36'35" longitud oeste), costa sur de la Península de Guanahacabibes (figura1), en julio del año 2016.



**Fig. 1-** Playas de la costa sur de la Península de Guanahacabibes. En negro aparece Playa Antonio

El proceso de selección fue realizado *in situ*, considerando las características taxonómicas y morfológicas de cada especie, reportadas en la literatura especializada para la región.<sup>(16)</sup> Tras la selección, las muestras de bioindicadores se lavaron con abundante agua de mar, luego fueron secadas al sol durante 72 h y finalmente se envasaron en bolsas de polietileno, siendo almacenadas en condiciones ambientales adecuadas.

## **Tratamiento previo de los bioindicadores**

Las especies colectadas se lavaron exhaustivamente con agua destilada para eliminar las sales y demás residuos sólidos impregnados. Luego fueron secadas en una estufa de ventilación natural MEMMERT854 (Alemania) a 60 °C por 24 h y después molidas en un molino planetario de bolas Retsch S100 (Alemania). Posteriormente se tamizaron en un tamiz vibratorio con regulación de potencia MLW, utilizando tamices de nylon PRESTOFF-PRÜFSIEB, con abertura nominal de 355 µm. Las fracciones de cada bioindicador con tamaño de partícula de 355µm o inferior fueron envasadas en frascos de polietileno de alta densidad KARTELL (Italia).<sup>(17)</sup>

## **Digestión de los bioindicadores**

Se emplearon dos procedimientos para la digestión por triplicado de los bioindicadores:

Método 1: Consistió en una digestión ácida total de 1 g de los bioindicadores secos con ácido nítrico al 65 %, ácido fluorhídrico al 40 % y ácido perclórico al 60 % (MERCK, con calidad para análisis) en crisoles de PTFE y calentando en una plancha STUART SB 300 (Reino Unido) hasta la aparición de vapores blancos. Luego las muestras se trasvasaron a un volumétrico de 50 mL, para su posterior enrase con una disolución de ácido clorhídrico  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (MERCK, con calidad para análisis).<sup>(18)</sup>

Método 2: Consistió en una digestión ácida total semejante al Método 1, pero en este caso se partió de la masa de cenizas obtenida a partir de 2 g de cada bioindicador. Luego, al igual que en el método anterior, las muestras se trasvasaron a un volumétrico de 50 mL, para su posterior enrase con una disolución de ácido clorhídrico  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .<sup>(19)</sup>

## **Caracterización de los bioindicadores**

### **Determinación del contenido de humedad**

Fracciones de 1 g de cada bioindicador se llevaron en crisoles de porcelana previamente tarados a una estufa con circulación natural MEMMERT 854 a 110° C por cinco horas, pesando los crisoles cada una hora tras el enfriamiento a temperatura ambiente durante 30 min en una desecadora con sílica gel. A continuación, se elevó la temperatura a 150 °C, repitiendo los pasos de enfriamiento y pesada hasta peso constante. La determinación se realizó por triplicado, expresando los resultados como la media de las tres réplicas y su intervalo de confianza. El contenido de humedad, expresado en tanto por ciento, fue determinado a partir de la ecuación (1).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{m(\text{inicial}) - m(\text{final})}{m(\text{inicial})} \cdot 100 \quad (1)$$

### **Determinación del contenido de cenizas**

Fracciones de 2 g de cada bioindicador se llevaron en crisoles de porcelana previamente tarados a una estufa con circulación natural MEMMERT 854 a 150 °C durante cinco horas, pesando los crisoles luego del enfriamiento a temperatura ambiente por 30 min en una desecadora con sílica gel. La masa obtenida tras este paso se considera la correspondiente al bioindicador seco. Posteriormente se colocaron los crisoles en una mufla MLW (Alemania), por dos horas a 600 °C, repitiendo los pasos de enfriamiento y pesada. La masa obtenida tras este paso se considera la correspondiente a las cenizas del bioindicador. La determinación se realizó por triplicado, expresando los resultados como la media de las tres réplicas y su intervalo de confianza. El contenido de cenizas, expresado en tanto por ciento, se calculó mediante la ecuación (2).

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{m(\text{cenizas})}{m(\text{bioindicador seco})} \cdot 100 \quad (2)$$

### **Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido con Dispersión de rayos x (SEM/EDX)**

Las muestras de bioindicadores utilizadas en este análisis se lavaron varias veces con agua destilada para remover las sales depositadas en la superficie de la pared celular de los bioindicadores, hasta obtener un agua de lavado con un valor de conductividad igual o inferior a 1 µS/cm. Para la medición de la conductividad fue utilizado un conductímetro METROHM 644, (Suiza). Posteriormente fueron secadas en una estufa con circulación natural MEMMERT 854 a 60 °C hasta peso constante. Finalmente, las muestras se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido con Dispersión de Energía de rayos x en un Microscopio Electrónico de Barrido TESCAN Vega 5130 SB3 (República Checa) a 20 kV con sonda EDX Oxford Instrument.

### **Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)**

Se prepararon tabletas de cada bioindicador en KBr (Reactivo MERCK con calidad espectroscópica), con un contenido de muestra de aproximadamente el 0,1 % del peso total de la tableta. Las mediciones fueron llevadas a cabo en un espectrómetro FT-IR RAYLEIGH 4000-400(China).

## Determinación del contenido catiónico

Las disoluciones resultantes de los dos procedimientos de digestión fueron utilizadas para realizar la determinación simultánea del contenido de Al, As, Fe, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Ti, V, Zn y P. Las mediciones se llevaron a cabo en un Espectrómetro Óptico de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), de análisis simultáneo Prodigy High Dispersión con detector de estado sólido (EUA). Las condiciones instrumentales de medición en el equipo de ICP-OES son: Modo de visualización Axial, Potencia (kW) 1,2, Flujo de nebulización (psi) 34, Flujo de muestra ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 0,8, Flujo refrigerante ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 18 y Flujo auxiliar ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 0,2.

El ensayo en blanco se realizó bajo las condiciones de preparación previamente establecidas en los procedimientos de digestión. Los resultados de este estudio se expresaron como la media de la concentración de cada elemento en las tres digestiones, dada en  $\mu\text{g}$  del elemento por g de bioindicador seco ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), para los dos métodos de digestión empleados y su intervalo de confianza. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo en el programa STATGRAPHICS Centurion XV, utilizando las pruebas de hipótesis ANOVA simple y Scheffé.

## Determinación del punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ )

La técnica de inmersión se empleó para la determinación del  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  de cada bioindicador. Con esta finalidad se realizaron suspensiones de los tres bioindicadores en una disolución de  $\text{KNO}_3$   $0,03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (MERCK, con calidad para análisis) en proporción de  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y ajustadas a valores de pH en el intervalo 1-8 con ácido clorhídrico  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e hidróxido de sodio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (MERCK, con calidad para análisis) en un pHmetro HANNA Instruments HI931402 (México). Las suspensiones se agitaron durante 24 h en una zaranda orbital Beijing Donglian Har Instrument HZS-H (China) a 250 rpm hasta alcanzar un valor de pH en equilibrio, posterior a lo cual se registró nuevamente el pH de estas.<sup>(20,21)</sup>

## Resultados y discusión

### Determinación del contenido de humedad

Los resultados del contenido de humedad para los bioindicadores estudiados se muestran en la tabla 1. El análisis estadístico realizado demostró que no existen diferencias significativas entre los bioindicadores *Thalassia testudinum* y *Sargassum buxifolium* con un 95 % de confianza. Contrariamente, el contenido de humedad obtenido para la especie *Syringodium filiforme* resultó diferente estadísticamente con respecto al resto de los bioindicadores. Los valores del contenido de humedad que se obtuvieron para cada bioindicador se correspondieron con los reportados por Mota da Silva y Silvia.<sup>(22)</sup> Finalmente, los resultados

de este estudio permitieron realizar correcciones a las cantidades de cada bioindicador necesarias en posteriores experimentos en función del contenido real de bioindicador seco.

**Tabla 1-** Contenido de humedad de los bioindicadores expresado en %

Especie	<i>Syringodium filiforme</i>	<i>Thalassia testudinum</i>	<i>Sargassum buxifolium</i>
Humedad (%)	10,9 ± 0,4	7,9 ± 0,3	7,4 ± 0,4

### Determinación del contenido de cenizas

Los resultados del contenido de cenizas para los bioindicadores en estudio se reportan en la Tabla 2. El análisis estadístico desarrollado permitió afirmar la existencia de diferencias significativas entre los tres bioindicadores para un 95 % de confianza. Los valores obtenidos del contenido de cenizas para cada bioindicador estuvieron en concordancia con los reportados por Mota da Silva y Silvia.<sup>(22)</sup> Este contenido determinado se corresponde con la cantidad de materia inorgánica que presentan los bioindicadores, y las diferencias son esperadas debido a la distinta naturaleza biológica de los materiales estudiados.

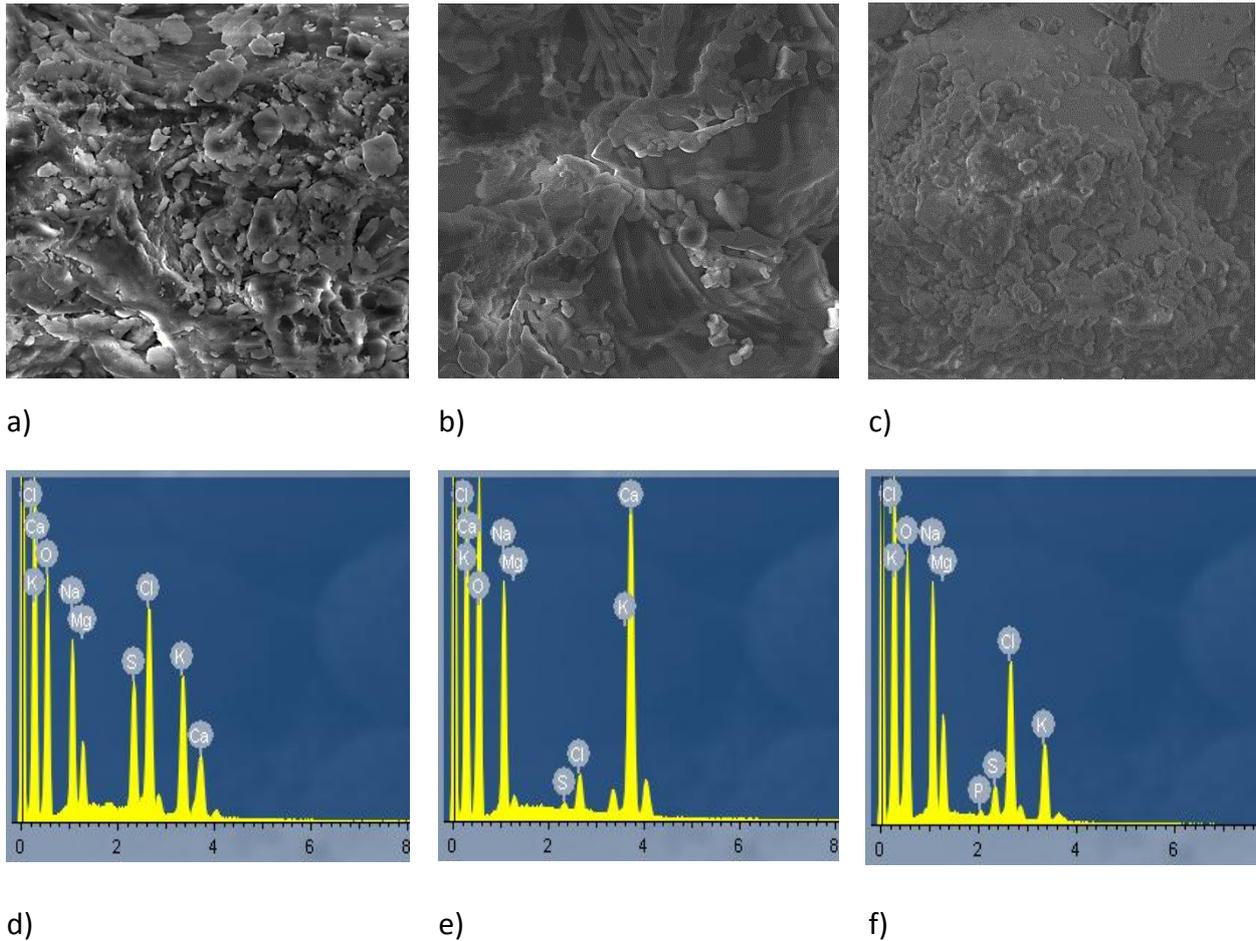
**Tabla 2-** Contenido de cenizas de los bioindicadores expresado en %

Especie	<i>Syringodium filiforme</i>	<i>Thalassia testudinum</i>	<i>Sargassum buxifolium</i>
Ceniza (%)	17 ± 2	26,4 ± 0,7	30 ± 3

### Análisis por SEM/EDX

El análisis por SEM/EDX permitió llevar a cabo la caracterización de la superficie de los bioindicador esa partir del estudio de su morfología y la determinación de su composición elemental, empleando las técnicas SEM y EDX respectivamente. La figura 2 muestra las micrografías SEM de los tres biomateriales (a, b y c) y los respectivos espectros EDX (d, e y f). Los porcentajes elementales obtenidos de los espectros EDX aparecen reportados en la tabla 3.

En las micrografías obtenidas fue posible apreciar la gran heterogeneidad morfológica y estructural existente en la superficie de los bioindicadores. En los espectros EDX se observaron las señales correspondientes a los elementos O, Na, S, Mg, Cl y K, así como Ca para las especies *Syringodium filiforme* y *Sargassum buxifolium* y P solo para *Thalassia testudinum*. Cabe la posibilidad que algunos de estos elementos participen en el proceso de intercambio de iones durante la biosorción o permanezcan ocupando los sitios de unión de la biomasa, bloqueando estos sitios para otros metales.



**Fig. 2-** Micrografías Electrónicas de Barrido obtenidas a una Resolución de 10 kx: a) *Sargassum buxifolium*, b) *Syringodium filiforme*, c) *Thalassia testudinum* y Espectros EDX: d) *Sargassum buxifolium*, e) *Syringodium filiforme*, f) *Thalassia testudinum*

Por otro lado, como se puede apreciar en la tabla 3, el O fue el elemento de mayor porcentaje en átomos y masa en los tres biomateriales, hecho que se debe a la existencia de una gran cantidad de biopolímeros en la pared celular. Adicionalmente, la presencia de Na, S, Cl y Mg en la superficie de los bioindicadores resultó ser congruente con la composición química del agua de mar, considerando que este es el medio natural de estas especies.

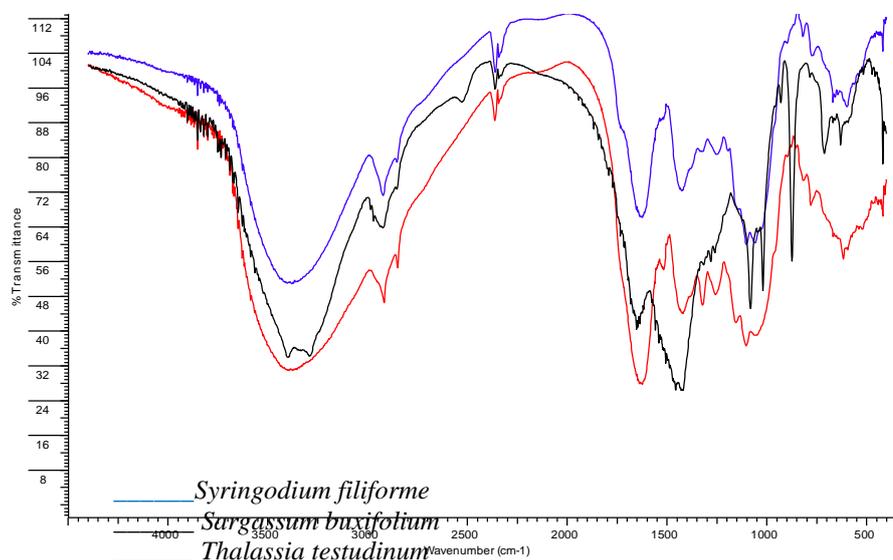
**Tabla 3-** Análisis elemental por EDX de los bioindicadores

Elemento	<i>Sargassum buxifolium</i>		<i>Syringodium filiforme</i>		<i>Thalassia testudinum</i>	
	% Masa	% Átomos	% Masa	% Átomos	% Masa	% Átomos
O	52,74	68,16	30,92	44,28	53,67	66,66
Na	11,79	10,60	29,88	29,78	18,56	16,04
Mg	3,83	3,26	2,90	2,73	7,49	6,12
S	5,69	3,67	1,87	1,34	1,78	1,10

<b>Cl</b>	11,86	6,92	28,51	18,42	11,46	6,43
<b>K</b>	9,44	4,99	4,82	2,83	6,56	3,34
<b>Ca</b>	4,66	2,40	1,11	0,63	-	-
<b>P</b>	-	-	-	-	0,49	0,31

### Análisis por FT-IR

En la figura 3 se presentan los espectros FT-IR de los tres bioindicadores en estudio. La presencia de un gran número de bandas en estos espectros es indicativa de la composición altamente compleja de estos biomateriales, asociada a la existencia de una gran cantidad de grupos funcionales superficiales.



**Fig. 3-** Espectros FT-IR de los bioindicadores estudiados

La posición de las bandas más representativas para cada bioindicador se muestra en la tabla 4, conjuntamente con las asignaciones atribuidas según la literatura correspondiente.

**Tabla 4-** Principales asignaciones de los espectros FT-IR de los bioindicadores estudiados

<i>Syringodium filiforme</i>		<i>Sargassum buxifolium</i>		<i>Thalassia testudinum</i>	
$\nu/\text{cm}^{-1}$	Asignación	$\nu/\text{cm}^{-1}$	Asignación	$\nu/\text{cm}^{-1}$	Asignación
3 388	$\nu^{\text{asoc}}_{\text{OH}} + \nu_{\text{N-H}}$	3 350; 3 288	$\nu^{\text{asoc}}_{\text{OH}} + \nu_{\text{N-H}}$	3 392	$\nu^{\text{asoc}}_{\text{OH}} + \nu_{\text{N-H}}$
2 922; 2 852	$\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$	2 923	$\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$	2 918; 2 850	$\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$
1 635	$\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$	1 651	$\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$	1 628	$\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$

1 419	$V_{COO}^s$	1 419	$V_{COO}^s$	1 423	$V_{COO}^s$
1 310	$V_{C-SO_3}^-$	-	-	1 315	$V_{C-SO_3}^-$
1 254	$V_{CO(-COOH)}$	-	-	1 260	$V_{CO(-COOH)}$
-	-	1 050	$V_{CO(-OH)}$	1 080	$V_{CO(-OH)}$
-	-	830	$V_{SO}$	-	-

Mediante los resultados de la tabla 4 fue posible constatar la existencia en estos espectros de señales asociadas a los grupos funcionales carboxilo y carboxilato, hidroxilo, amino, y, en ciertos casos, grupos sulfónicos y sulfóxidos. Estos grupos funcionales se corresponden con los más comúnmente encontrados en los principales compuestos constituyentes de la pared celular de estos tres bioindicadores: ácido algínico, alginatos, proteínas y polisacáridos. De esta forma, la presencia de estos grupos funcionales pudiera explicar la capacidad de interacción superficial de estas especies con los metales pesados del medio, ya sea mediante atracción electrostática como por formación de complejos.

### Determinación del contenido catiónico

En la tabla 5 se muestran, por cada método de digestión empleado, las concentraciones en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  obtenidas mediante la técnica ICP-OES para los 13 elementos estudiados en los bioindicadores. Según estos resultados, la mayoría de los elementos en estudio fueron detectados en los tres bioindicadores por al menos uno de los métodos de digestión empleados. Fuera de esta regularidad se encontró el Cd, solo identificado en *Sargassum buxifolium*, así como los elementos Cr, Ti y As, los cuales no se determinaron en las *Thalassia testudinum*, *Sargassum buxifolium* y *Syringodium filiforme* respectivamente.

**Tabla 5-** Contenido catiónico de los bioindicadores para cada método de digestión empleado

Elemento	Concentración ( $\mu\text{g}$ de elemento/g de bioindicador seco)					
	<i>Sargassum buxifolium</i>		<i>Syringodium filiforme</i>		<i>Thalassia testudinum</i>	
	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 1	Digestión 2
<b>Al</b>	3,2 ± 0,7	3,0 ± 0,9	9 ± 4	8,3 ± 0,4	4 ± 2	3 ± 1
<b>As</b>	7 ± 1	2,1 ± 0,2	ND	ND	8,7 ± 0,4	ND
<b>Fe</b>	84 ± 7	40 ± 10	130 ± 20	29 ± 2	110 ± 20	49 ± 5
<b>Cd</b>	3,4 ± 0,4	2,0 ± 0,9	ND	ND	ND	ND
<b>Cr</b>	ND	1,6 ± 0,2	ND	0,5 ± 0,2	ND	ND
<b>Cu</b>	11,1 ± 0,3	8,4 ± 0,5	11 ± 1	4,3 ± 0,5	18 ± 4	13,6 ± 0,2
<b>Mg</b>	5 200 ± 300	2 800 ± 100	3 700 ± 40	2 630 ± 20	3 980 ± 40	2 900 ± 100
<b>Mn</b>	70 ± 20	60 ± 20	60 ± 6	56 ± 4	95 ± 3	50 ± 10

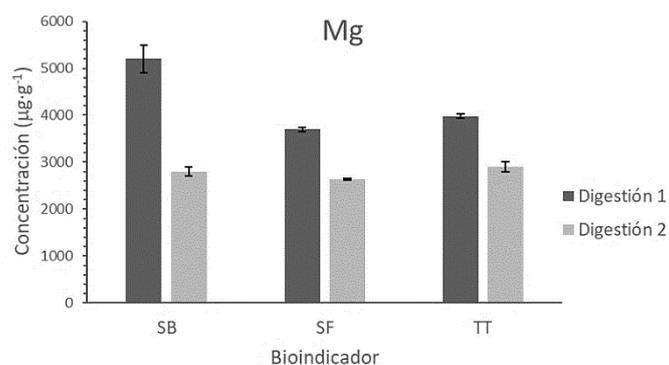
<b>Ni</b>	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,7	11 ± 2	ND	8 ± 2	3 ± 1
<b>Ti</b>	ND	ND	1,6 ± 0,4	ND	3,6 ± 0,4	ND
<b>V</b>	3,0 ± 0,1	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,5	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2
<b>Zn</b>	22 ± 5	13 ± 3	20 ± 5	11 ± 5	18 ± 1	8 ± 2
<b>P</b>	1 100 ± 100	410 ± 70	700 ± 100	570 ± 60	840 ± 40	600 ± 100

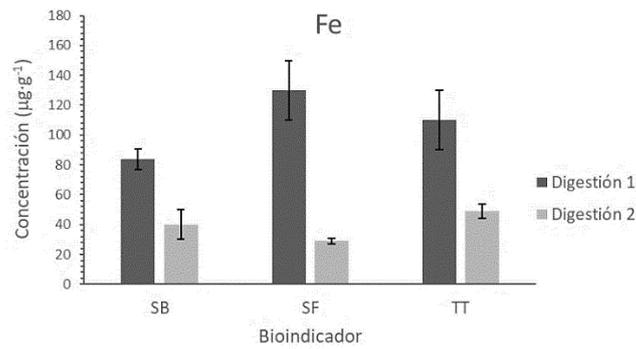
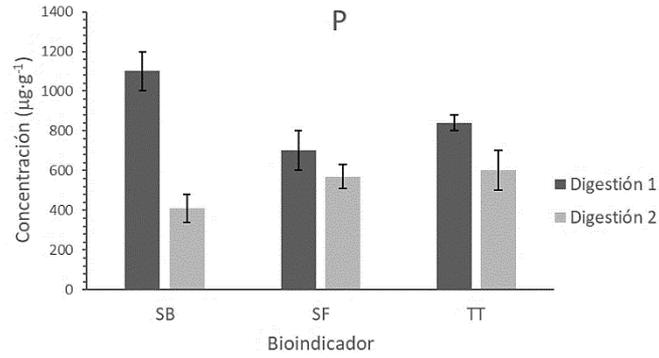
Además, puede apreciarse que existen una serie de elementos que solo fueron encontrados en las digestiones correspondientes al Método 2, siendo estos: Ti, en *Syringodium filiforme* y *Thalassia testudinum*, Ni, en *Syringodium filiforme* y As, en *Thalassia testudinum*.

Adicionalmente, para *Sargassum buxifolium* y *Syringodium filiforme* no fue detectado el Cr en las digestiones obtenidas mediante el Método 1. Este hecho fue atribuido a la posible formación del compuesto volátil cloruro de cromilo durante el paso de calentamiento en presencia de la disolución de ácido perclórico, ocurriendo de esta manera su salida del medio como parte de los humos blancos de la propia digestión.

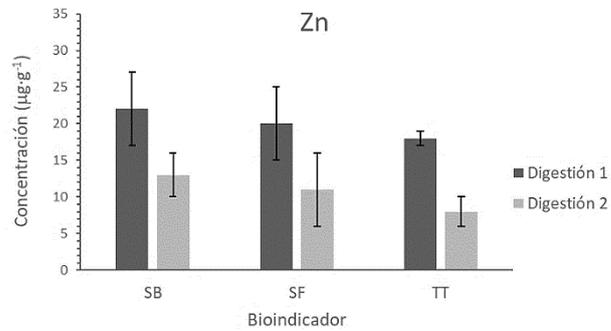
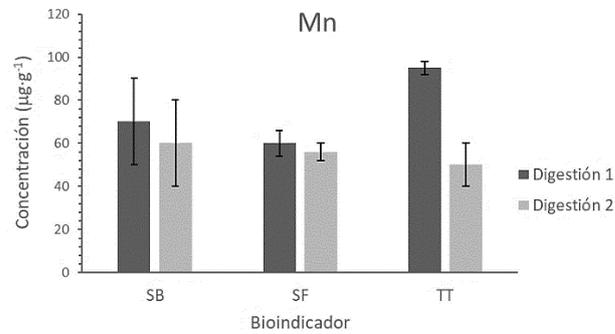
Por otro lado, el Mg constituyó el elemento determinado en los bioindicadores de más alta concentración. Este resultado estuvo en correspondencia con el análisis elemental de la superficie de los bioindicadores realizado mediante EDX, donde el Mg se encontró entre los cationes identificados. Además, junto con el Mg, los elementos P, Fe, Mn, Zn y Cu coincidieron para las tres especies como los mayoritarios, independientemente del método de digestión. De esta manera, fue posible afirmar que estos elementos determinan casi exclusivamente el contenido catiónico de los biomateriales estudiados. Este resultado se encontró en concordancia con lo reportado en los trabajos de Casas-Valdez *et al.* <sup>(23)</sup>, Yang y Chen <sup>(24)</sup> y Sierra y Álvarez <sup>(25)</sup> para el caso específico de la especie *Sargassum buxifolium*.

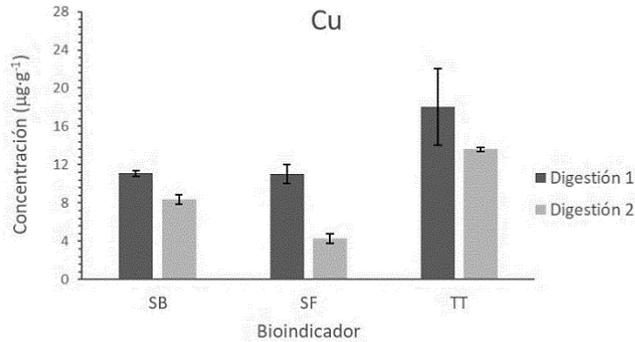
En consideración con lo anterior, el contenido promedio de estos 6 elementos para cada bioindicador y por método de digestión (figuras 4 y 5) fue empleado en estudios estadísticos basados en las comparaciones de los tres biomateriales y los dos métodos de digestión usados.





**Fig. 4-** Concentración media de Mg, P y Fe ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en las especies *Sargassum buxifolium* (SB), *Syringodium filiforme* (SF) y *Thalassia testudinum* (TT) para cada método de digestión



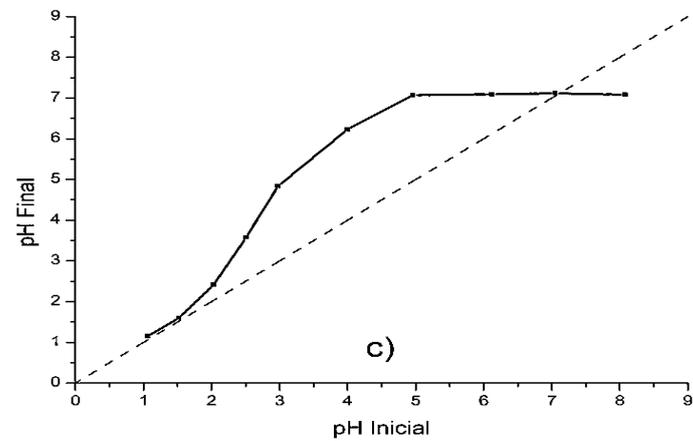
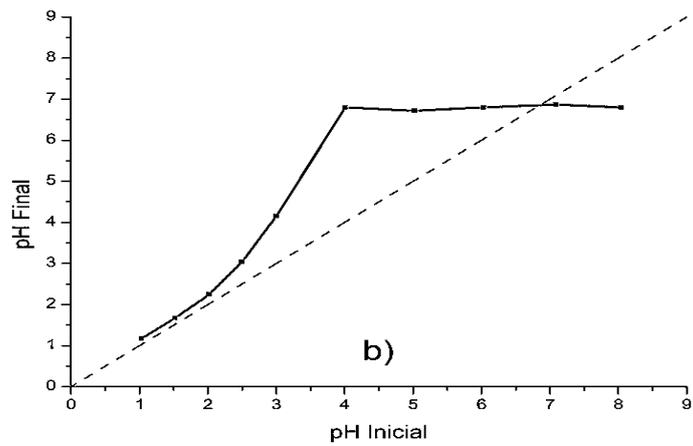
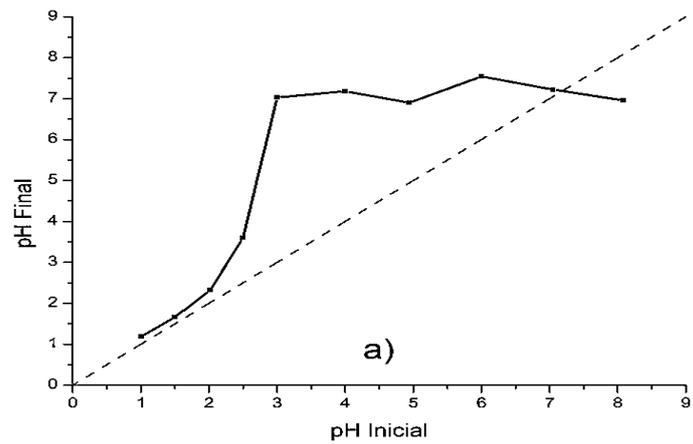


**Fig. 5-** Concentración media de Mn, Zn y Cu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en las especies *Sargassum buxifolium* (SB), *Syringodium filiforme* (SF) y *Thalassia testudinum* (TT) para cada método de digestión

En los estudios desarrollados, primeramente, fueron encontradas de forma mayoritaria diferencias estadísticas con un 95 % de confianza entre los tres bioindicadores para los 6 elementos, obteniendo un mayor contenido de Mg, P y Zn en *Sargassum buxifolium*, así como de Mn y Cu en *Thalassia testudinum* y de Fe en *Syringodium filiforme*. En segundo lugar, los dos métodos de digestión empleados resultaron estadísticamente diferentes para los 6 elementos con un 95 % de confianza, destacándose la obtención en todos los casos de un mayor contenido elemental en las digestiones realizadas mediante el Método 1. Por tal motivo, este método fue seleccionado como el más adecuado para llevar a cabo la digestión de los bioindicadores en experimentos futuros.

### Determinación del $\text{pH}_{\text{pzc}}$

En la figura 6 aparecen los gráficos de pH final vs pH inicial obtenidos para los tres bioindicadores, donde las intercepciones de estas curvas con la función  $y=x$  constituyen los correspondientes valores del  $\text{pH}_{\text{pzc}}$ . Como es posible apreciar en la tabla 6, los valores que se obtuvieron para los biomateriales resultaron semejantes, encontrándose incluidos los mismos dentro de la zona neutral. Es sabido que a valores de pH por encima del  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  la superficie del sorbente asume una carga neta negativa, lo cual favorece las interacciones con centros positivos.<sup>(21)</sup> De esta forma, tomando en consideración que el pH del agua de mar se encuentra normalmente entre 8-9 unidades, fue respaldada la hipótesis de la posible existencia de un mecanismo de interacción electrostática entre grupos funcionales superficiales con carga negativa de los bioindicadores y las especies catiónicas. Por otro lado, las mínimas diferencias entre los valores obtenidos para el  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  evidenciaron que, si bien las especies objeto de estudio presentan una similitud estructural considerable, la distribución superficial de los distintos grupos funcionales tiende a ser diferente para cada biomaterial.



**Fig. 6-** Resultados obtenidos mediante la técnica de inmersión para: a) *Sargassum buxifolium*, b) *Syringodium filiforme* y c) *Thalassia testudinum*. En negro se muestra la curva de pH Final vs pH Inicial y en líneas discontinuas la función  $y = x$  en el intervalo 0-9

**Tabla 6-** Valores del  $pH_{pzc}$  de los bioindicadores

Especie	<i>Syringodium filiforme</i>	<i>Thalassia testudinum</i>	<i>Sargassum buxifolium</i>
$pH_{pzc}$	6,8	7,1	7,4

## Conclusiones

Los diferentes estudios realizados para la caracterización de los bioindicadores *Sargassum buxifolium*, *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* permitieron constatar que tanto la morfología como la composición química de la pared celular de estas tres especies favorecen el proceso de incorporación de elementos metálicos en la misma. De esta forma se evidencian las potencialidades de estos bioindicadores para la biosorción de metales pesados del medio acuático y, consecuentemente, se respalda su uso en futuros estudios de la calidad ambiental del ecosistema marino de la costa sur de la Península de Guanahacabibes.

## Agradecimientos

Los autores del presente trabajo desean agradecer al Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE) de la Universidad de La Habana y a la Dra. Julia Azanza Ricardo del Instituto de Ciencia y Tecnología Aplicada (InSTEC) de la Universidad de La Habana.

## Referencias bibliográficas

1. LEYVA, G.; BAENA, G. S. *Guanahacabibes donde se guarda el sol de Cuba*. La Habana: Editorial Academia, 2002. ISBN 78-959-02-0332-9.
2. RUIZ, I. *Las Áreas Protegidas de Cuba*. Edtion ed. La Habana: Centro Nacional de Áreas Protegidas, 2017. ISBN 978-959-287-079-6.
3. MÁRQUEZ, L., G. BAENA, G. LEYVA, P. M. DE CELIS, *et al.* Plan de Manejo 2012 - 2016 Área Protegida de Recursos Manejados Península de Guanahacabibes. Pinar del Río, 2011.
4. RAINBOW, P. S. "Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment". *Marine Pollution Bulletin*. 1995, **31**, 183-192. ISSN 0025-326X.
5. PHILLIPS, D. J. H. "The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments". *A review. Enviromental Pollution*. 1997, **13**, 281-317. ISSN0269-7491.
6. MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. *Bioindicators and Biomonitors*. edited by J.O. NRIAGU. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd, 2003. ISBN 978-008-052-797-0.

7. EIDE, I.; MYKLESTAD, S.; MELSON, S. "Long-term uptake and release of heavy metals by *ascophyllum nodosum* L. (Phaeophyceae) in situ". *Environmental Pollution*. 1980, **23**, 19-28. ISSN 0269-7491.
8. WHELAN, T., ESPINOZA, J. X.; VILLARREAL; COTTAGOMA, M. "Trace metal partitioning in *Thalassia testudinum* and sediments in the Lower Laguna Madre, Texas". *Environment International*. 2005, **31** (1), 15-24. ISSN0160-4120.
9. MASSOL DEYÁ, A.; PÉREZ, D. E.; PÉREZ, M.; BERRIOS, *et al.* Trace Elements Analysis in Forage Samples from a US Navy Bombing Range (Vieques, Puerto Rico). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2005, **2** (2), 263-266. ISSN 1660-4601.
10. SOLÍS, C.; K. ISAAC OLIVÉ, A.; MARTÍNEZ, E.; LAVOISIER, *et al.* "Trace metals in the seagrass *Thalassia testudinum* from the Mexican Caribbean coast". *X-Ray Spectrometry*. 2008, **37**, 103-106. ISSN 1097-4539.
11. VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. "Biosorption of Heavy Metals". *Biotechnology Progress*. 1995, **11**, 235-250. ISSN 978-084-934-917-1.
12. FOUREST, E.; VOLESKY, B. "Contribution of Sulfonate Groups and Alginate to Heavy Metal Biosorption by the Dry Biomass of *Sargassum fluitans*". *Environmental Science and Technology*, 1996, **30**, 277-282. ISSN 1520-5851.
13. VOLESKY, B.; VIEIRA, F. S. "Biosorption: a solution to pollution?". *International Microbiology*. 2000, **3**, 17-24. ISSN 1618-1905.
14. DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 2003, **37**, 4311-4330. ISSN 0043-1354.
15. DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, F. S. "Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metal". *Water Research*. 2000, **34** (17), 4270-4278. ISSN 0043-1354.
16. LITTLER, D. S.; LITTLER, M. M. *Caribbean Reef Plants*. Edition ed. Washington: OffShore Graphics, Inc., 2000. ISBN 0-967-8901-0-1.
17. BALBÍN, A. I.; ESTEVA, A. M.; PIÑA, J. J.; MACCINI, M. "Analytical method for heavy metal determination in algae and turtle eggs from Guanahacabibes Protected Sea Park". *Journal of Electrochemical Science and Engineering*. 2014, **4** (4), 145-154. ISSN 1847-9286.
18. KEITH, L. K. *Compilation of EPA's Sampling and Analysis Methods*. Edition ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1996. ISBN 1-56670-170-8.
19. MESTRE, Z.; STURGEON, R. *Sample preparation for trace element analysis*. edited by D. BARCELÓ. Edition ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2003. ISBN 0-444-51101-6.
20. NASIRUDDIN KHAN, M.; SARWAR, A. "Determination of points of zero charge of natural and treated adsorbents". *Surface Review and Letters*. 2007, **14** (3), 461-469. ISSN 1793-6667.
21. FIOL, N.; VILLAESCUSA, I. "Determination of sorbent point zero charge: usefulness in sorption studies". *Environmental Chemistry and Letters*. 2009, **7**, 79-84. ISSN 1610-3661.

22. MOTA DA SILVA, V.; SILVIA, L. A. "Determination of moisture content and water activity in algae and fish by thermoanalytical techniques". *Quimica Nova*. 2008, **31** (4), 901-905. ISSN 1678-7064.
23. CASAS VALDEZ, M. *et al.* "El alga marina Sargassum (Sargassaceae): Una alternativa tropical para la alimentación de ganado caprino". *Revista de Biología Tropical*. 2006, **54** (1), 83-92. ISSN0034-7744.
24. YANG, L.; CHEN, P. J. "Biosorption of hexavalent chromium onto raw and chemically modified Sargassum sp". *Bioresource Technology*. 2008, **99**, 297-307. ISSN 0960-8524.
25. SIERRA, L.; ÁLVAREZ, R. "Comparación Bromatológica de las algas nativas (*Gracilariopsis tenuifrons*, *Sargassum filipendula*) y exótica (*Kappaphycus Alvarezii*) del caribe colombiano". *Boletín Científico. Museo de Historia Natural*. 2009, **13**, 17-25.