

## Cuantificación de proteínas y clorofila como indicadores de polución en *Rizophora harrisonii* en el Puerto de Guayaquil.

\*Quevedo<sup>1</sup> O., W. Sierra<sup>2</sup>, P. Manzano<sup>3</sup> y A. Barragán.<sup>4</sup>

\*Universidad de Guayaquil- estudiante de doctorado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos<sup>1</sup>.

Universidad de Guayaquil- Egresado de Ingeniería Química.

Escuela Superior Politécnica del Litoral – Jefa del Dpto. de laboratorio de bioproductos CIBE

Escuela Superior Politécnica del Litoral- Analista de laboratorio de bioproductos CIBE.

[olga.quevedop@ug.edu.ec](mailto:olga.quevedop@ug.edu.ec).

Guayaquil – Ecuador

### Resumen

La polución atmosférica generada por la actividad industrial naviera, de termoeléctricas, cementera y producción de acero, son elementos que no se han analizado respecto a cómo inciden en la calidad de vida de los manglares, este estudio es un preliminar de la tesis de doctorado, en la que se medirá otras variables que afectan la calidad de vida de los manglares, se referencian por primera vez las concentraciones de proteína solubles y clorofila para *Rizophora harrisonii* en un área poluida vs. Un área conservada, en total se colectaron 180 hojas de sol durante la marea alta, en cuatro transectos durante el mes de agosto (época seca). Las muestras colectadas se analizaron desde métodos químicos como el de Bradford para la determinación de proteína soluble y extracción de clorofila con acetona al 80%. Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente con ANOVA simple de una vía, con el programa Statgraphic 5.1 portable, se encontró que las medias de las concentraciones de clorofila y proteínas son significativamente más altas que las de la zona de control, 0.00985428 entre el transecto 3 y 4 para proteínas y en los mismos transectos para clorofila a con el valor de 3.47761; lo que permite deducir que otras variables como suelo, pH, minerales de las hojas, requieren ser correlacionadas para confirmar que los valores mayores registrados en las zonas poluidas son una respuesta de adaptación al medio o resiliencia por parte de *Rizophora harrisonii*.

**Palabras clave:** proteínas solubles, *Rizophora harrisonii*, clorofila, estuario de Guayaquil.

## Abstract

The atmospheric pollution to proceed by ship activities in port of Guayaquil, in addition to thermal power, cement and steel production, they have not been analyzed, like around over mangroves health life, this study, is a preliminary from the thesis doctoral. Will be measured others variables that effect to mangroves, it is referenced for first time the proteins and chlorophil from *Rizophora harrisonii*, from two sites, one contaminated and other more

Pristine named for the study "control". It is collecting 180 samples from leaves sun, during the high tide, into four transects, in august (dry season). The sampling collected it was analyzing from chemical methods, like Bradfor, for determination the protein and chlorophil with 80% acetone. it was apply stadistic program STATGRAPHIC 5.1 portable, for obtain results with ANOVA simple one way. It was found that average from protein and Clorophil are high in comparison with the control 0.009855428 between transect 3 and 4, and the same transects for chlorophil with a values 3.47761; in conclusion others variable correlations are need for to confirm, the major values registered in a pollution sites, are an answer from mangroves like resilience.

**Key words:** proteins, *Rizophora harrisonii*, clhorophil, stuary from Guayaquil.

## Introducción

La Reserva de Producción faunística El Salado, conserva una superficie aproximada de 9748 has. compuestas por manglar, salitrales, y esteros (Acuerdo Ministerial No. 158, 2010), es parte del estuario interior del Golfo de Guayaquil, la marea incide hasta 230 km. de superficie de entrada hasta la zona continental, por lo que es considerada una de las entradas más sobresalientes del Pacífico Sur, accidente geográfico que influye en la costa central del Ecuador.

La distribución ecológica de los manglares en la Reserva de Producción Faunística Manglares del Salado, fue caracterizada (MAE, 2012), como *Avicennia germinans* (mangle negro), *Conocarpus erectus* (mangle botón), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Rhizophora harrisonii* (mangle rojo), *Rhizophora mangle* (mangle rojo) y *Rhizophora racemosa* (mangle rojo), esta distribución de las especies también está vinculada con el tipo de sedimentación y las concentraciones de sal, (Schaeffer-Novelli & *et.al*; 1990) Las mareas del golfo presentan dos pleamares y dos bajamares en un tiempo de 24.8 horas.

El rango de la marea cambia entre 1.5 m. cuadratura a 2.3 m. en sicigia y en el estuario interior, cerca de la ciudad de Guayaquil, el rango está entre 2.9 m. en cuadratura y 4.0 en sicigia. La onda de marea recorre aproximadamente, entre 130 y 70 km. a lo largo del río Guayas y el Estero Salado, los rangos de salinidad en la época lluviosa entre 0.0 y 10.0 ppt en el reflujó, y en época seca en el flujo varía entre 10 ppt y 33.0 ppt.; (Proyecto VUB, INOCAR & ESPOL, 1997).

Los manglares del Puerto de Guayaquil soportan un tránsito naviero semanal de 10 a 12 barcos que entran y salen del Puerto de Guayaquil (DRI - CEPAL –ONU, 2011) y representan al 34% de los 4801 barcos que entraron y salieron en el 2013 de los puertos del país, se registraron 802 naves que ingresaron, y 754 *c.a.*, que salieron con cargas de 300 a 700 contenedores, de 20 a 40 pies del Puerto de Guayaquil, (INEC, 2013).

La actividad naviera del Puerto de Guayaquil, influye en la calidad de los manglares, afectando las hojas con el cubrimiento de hollín que se adhiere a las hojas, observ. Pers. En zonas aledañas a la zona de cuarentena del Puerto de Guayaquil en el 2011.

De acuerdo a lo identificado por el Ministerio del Ambiente, señala que los manglares del Golfo de Guayaquil están en franco proceso de deterioro, por las actividades antrópicas como el desfogue de aguas servidas, el cierre de esteros, los rellenos, infraestructuras navieras, industriales, entre otros.

La afectación por el tránsito naviero, sus efluentes líquidos y gaseosos, generados por el manejo de las actividades de embarque y desembarque y de los productos que se receptan, no han sido reportados ni relacionados como grados de afectación a la salud de los manglares.

Las concentraciones de SO<sub>2</sub> provocan afectaciones a la vegetación, lo cual va además relacionado con la diversidad de climas, que disminuye la probabilidad de las predicciones y debe ser considerado en la implementación de políticas (Wilson, 1995).

Se encontraron daños visibles severos en forma de clorosis y necrosis a valores más bajos de pH, e incluso los valores de nutrientes mostraron cambios después de las exposiciones en mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle rojo (*Rhizophora harrisonii*), y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*), (Cerón, *et.al.*, 2010 y Cerón 2009), la exposición a mayores concentraciones de SO<sub>2</sub>, mayor pérdida de clorofila, junto al incremento en los niveles de proteínas solubles, explica que las plantas tienen capacidad de metabolizar este compuesto.

El presente estudio determinará la concentración de proteínas solubles y clorofila en *Rhizophora harrisonii*, mediante espectrofotometría de luz visible como indicadores de la contaminación atmosférica en un sector del Puerto de Guayaquil.

Se validó la técnica para proteína soluble mediante el método de Bradford en manglar rojo (*Rhizophora Harrisonii*) y referenció la concentración del mismo, con el control o blanco del estuario del interior del Golfo de Guayaquil, respecto a la zona de influencia en el Puerto de Guayaquil.

Los valores de clorofila también fueron medidos con la finalidad de reconocer diferencias significativas entre el control y las zonas que están directamente influenciadas por la actividad naviera e industrial en el sector.

### Área de Estudio

El Puerto de Guayaquil se encuentra dentro del Golfo del mismo nombre, en la provincia del Guayas, representa al 34% de todos los puertos del Ecuador (INEC, 2013), está rodeado de manglar, cuya superficie es de 11223,33 has. (MAE, 2012) sólo como área de influencia para el estudio, por el oeste y por la ciudad de Guayaquil desde el sur-este. Además de estar rodeado de las industrias del acero, las termoeléctricas, y la cementera.

Se escogió un control o blanco a la Isla Chupador Chico en la comunidad Cerrito de Los Morreños, del Humedal Estuario interior del Golfo de Guayaquil “Don Goyo”, Fig. 2 para referenciar por primera vez los valores de proteínas y clorofilas en el manglar de la provincia del Guayas, se considera que es uno de los sitios mejor conservados y aislados de focos de contaminación.

Las muestras se tomaron de la Isla Trinitaria Fig. 1, afectada por las actividades antrópicas, se agruparon en tres transectos, seleccionados por su proximidad con los puertos navieros, la termoeléctrica y la base naval, el transecto uno se encuentra hacia el interior de la isla entrando por el estero la Capitanía, el transecto dos está frente al Puerto de CONTECON y el transecto tres está al interior de la isla ingresando por un estero, en su afluente principal transitan los barcos que se dirigen al Trini-Puerto.

**Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios muestreados durante la época seca**

Transectos	Coordenadas (y)	Coordenadas (x)
I	620420	9749793
II	620676	9750213
III	619754	9748910
IV	620802	9724302



Fig. 1 Sitios de muestro en el Puerto de Guayaquil, Ecuador



Fuente: Ficha Informativa Ramsar, 2009

Fig. 2 Area de control en el Estuario Interior del Golfo de Guayaquil, Ecuador.

### Metodología

Se identificaron tres transectos Fig. 1, y un control o blanco Fig. 2, de manera azarosa, en la isla Trinitaria, del estero Salado de Guayaquil frente al Puerto marítimo de Guayaquil, y en la isla Chupador Chico en el Humedal “Estuario interior del Golfo de Guayaquil – Don Goyo” respectivamente; los transectos miden 100 x 0,50 m de superficie, se colectaron 180 hojas de *Rizophora harrisonii* única especie presente, la colecta se realizó en marea alta y durante el mes de agosto, época seca, se usó una embarcación de madera desde la cual se recogieron las hojas del dosel o de techo expuestas directamente al sol. Las muestras tomadas en cada uno de los transectos fueron etiquetadas y guardadas en fundas ziploc e inmediatamente conservadas en refrigeración. Estas hojas se dividieron en dos partes simétricas (A y B) para la determinación de clorofila y proteínas solubles respectivamente, se extrajo 100 mg de cada una. Para la obtención de los datos de clorofila y de proteínas solubles, se utilizó el peso fresco de ambas partes.

### Determinación de Clorofila

Los 100 mg de muestra, pesadas en Balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S) previamente cortadas parte “A”, se las coloca en una cápsula de porcelana y se les agrega 1 ml de acetona al 80% para ser macerada hasta obtener una mezcla uniforme. Posteriormente se coloca 1 ml de la mezcla en un tubo eppendorf y se la centrifugó en una Microcentrífuga (Jouan SA A-12) a 1500 rpm durante 1 minuto. Finalmente se toman 200  $\mu$ l del sobrenadante para ser colocados en una microplaca de 96 pocillos.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro “BioTek Synergy HT” para las siguientes ondas del espectro: 663, 646, 470, 430 y 665 nm. Finalmente, las clorofilas fueron cuantificadas por unidad de masa usando las ecuaciones Lichtenthaler, (1987).

### Determinación de proteínas solubles

#### Preparación del estándar

Para preparar el estándar patrón de suero bovino 1 mg /ml, se pesó 10 mg del reactivo y luego lo agregamos en un matraz aforado de 10 ml y se añadió agua destilada hasta enrazar, en los siguientes estándares para la calibración fueron 10  $\mu$ l/ml, 20  $\mu$ l/ml, 40  $\mu$ l/ml, 60  $\mu$ l/ml, 80  $\mu$ l/ml 100  $\mu$ l/ml.

Para el análisis de las proteínas solubles se usaron las muestras de la parte B de la hoja, utilizando el método de Bradford. Para la extracción de las proteínas se procedió a moler 100 mg de las muestras en fresco con 3 ml de la solución Buffer fosfato de potasio. En un tubo microcentrífuga eppendorf, se agregó 1 ml de la muestra ya molida con el Buffer y se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 10 %, dejando reposar toda la noche en refrigeración.

Al siguiente día, las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 10.000 rpm, desechando el sobrenadante y dejando el sedimento con 1 ml de NaOH 1 N durante 2 horas.

En una placa de 96 pocillos se agregaron 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford-agua destilada (1:5 v/v) con 10  $\mu$ l de la muestra para su lectura en el espectrofotómetro (marca) a 595 nm.

## Resultados y discusión

**Análisis estadístico:** la determinación de los valores de las medias fueron calculadas usando anova simple de una vía para encontrar las diferencias significativas entre los transectos y el control. Todas las determinaciones demostraron diferencias significativas, se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1.

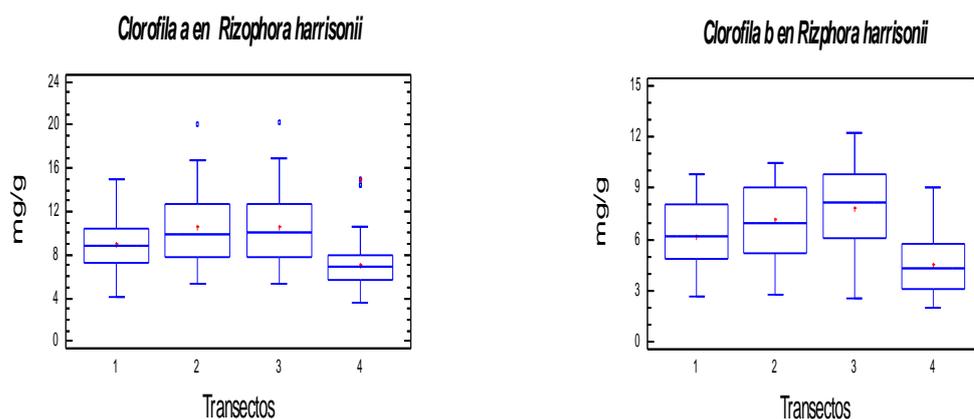


Figura 3.y 4 Clorofila a y b por transectos en *Rizophora harrisonii*

**Pigmentos fotosintéticos:** se concluye que hay diferencias estadísticamente significativas de clorofila a (Tabla 2) entre los transectos estudiados, Fig. 3 y 4 las diferencias significativa es de 3.47761 en este caso el 4to transecto que es el control, con valores más bajos de clorofila a, en comparación al resto de transectos, los valores altos en relación al control pueden ser producto del estrés al que están sometidos los arboles de *Rizophora harrisonii* en zonas con procesos de contaminación atmosférica generada por la actividad naviera, la termoeléctrica y lo que se observó en campo gusanos de lepidópteros de la familia *geometridae*, ramoneando hojas de manglar.

**Proteínas:** los valores reflejados para las proteínas solubles en las hojas de *Rizophora harrisonii* son significativamente diferentes entre las medias determinadas para el control (4) y los transectos 1,2 y 3, además de una diferencia significativa de las medias de 0.00985428 entre el transecto 3 y 4 (Tabla 2 y Figura 5).

Tabla 2. Medias significativas de Clorofila a, b Carotenos y Proteína soluble				
<i>Rizophora harrisonii</i>				
Transectos	Proteína soluble	Clorofila a	Clorofila b	Caroteno
1-4				2.08079
2-4		3.4255	2.5904	3.547
3-4		3.47761	3.3024	3.5161
4	0.00985			

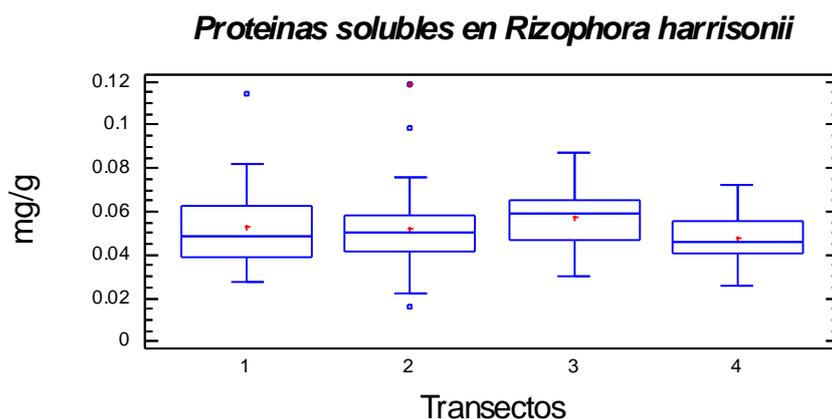


Figura 5. Proteínas solubles por transectos en *Rizophora harrisonii*.

En conclusión la especie de mangle *Rizophora harrisonii* presenta concentraciones mayores de clorofila así como de proteína en los transectos 1,2 y 3 en relación al transecto cuatro o control.

## Bibliografía

Acuerdo Ministerial No. 158; (2010), Límites de la Reserva de Producción faunística manglares del Salado.

Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), 2012. Caracterización biológica del Estero Salado en ramales con diferentes tipos de desarrollo Urbano CDC-SGMC-GE-004-2012. Preparado por ECOBIOTEC, noviembre de 2012.

Schaeffer-Novelli Y.; G. Cintrón-Molero; R. Rothleder Adaime; & T. Camargo, (1990). Variability of Mangrove Ecosystems along the Brazilian Coast *Estuaries*, Vol. 13, No. 2. (Jun., 1990), pp. 204-218. Stable URL.

Proyecto VUB, INOCAR & ESPOL, (1997). Construction of an interdisciplinary geographic information system (G.I.S.) OF THE Guayaquil area in order to the monitoring and modelling of the Guayas estuary and the Estero Salado. Vrije Universiteit Brussel. Research projects (70 -8 of 7401). [www.researchportal.be](http://www.researchportal.be)-25 Apr 2015 17:36:20 Search filter: classifications: PHYSICAL SCIENCES (P)

DRNI - CEPAL - Naciones Unidas, 2011. Unidad de Servicios de Infraestructura, *Source: Infrastructure Services Unit - NRID – ECLAC - United Nations, 2011.*

INEC, (2013). *Anuario de Estadísticas de Transporte*. Dirección responsable de la información estadística, y contenido: Dirección de Estadísticas Económicas. Dirección electrónica: [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec).

Wilson, S.A. Are Mediterranean Plant likely to have a distinctive response to SO<sub>2</sub> pollution?  
Revista: Agriculture, Ecosystems and Environment 55- (1995) 71-93, y Elsevier. Review.

Cerón, J., R. Cerón, J. Guerra, J. López y E. Endañu. 2009 Efectos de contaminantes atmosféricos sobre especies de vegetación representativa de la zona costera del Estado de Campeche, Universidad Autónoma del Carmen, México. WIT Transactions on Ecology and the Environment, Vol 126, WIT Press www. Witpress.com, ISSN 174-3541 (on-line) doi: 10.2495/CP090231.

Cerón-Bretón, J. G; Cerón- Bretón, R. M; Guerra – Santos, J. J; Cordova – Quiroz, A. V.; Vargas Caliz, C; Aguilar- Becomo, L. G; Rodríguez – Heredia, K; Bedolla-Zavala, E. y Pèrez-Alonso, J. (2010). Efectos de la Simulación de Ozono troposférico en proteínas solubles y niveles de pigmentos fotosintéticos en cuatro especies de maderas Típicas del húmedo trópico mexicano. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma del Carmen (UNACAR). Calle 56 Num. 4 por avenida Concordina. C. P. 24180. Colonia Benito Juárez. Ciudad del Carmen, Campeche – México. [jceron@pampano.unacar.mx](mailto:jceron@pampano.unacar.mx)  
<http://www.unacar.mx>.

Lichtenthaler, HK. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of Photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148: 350-382