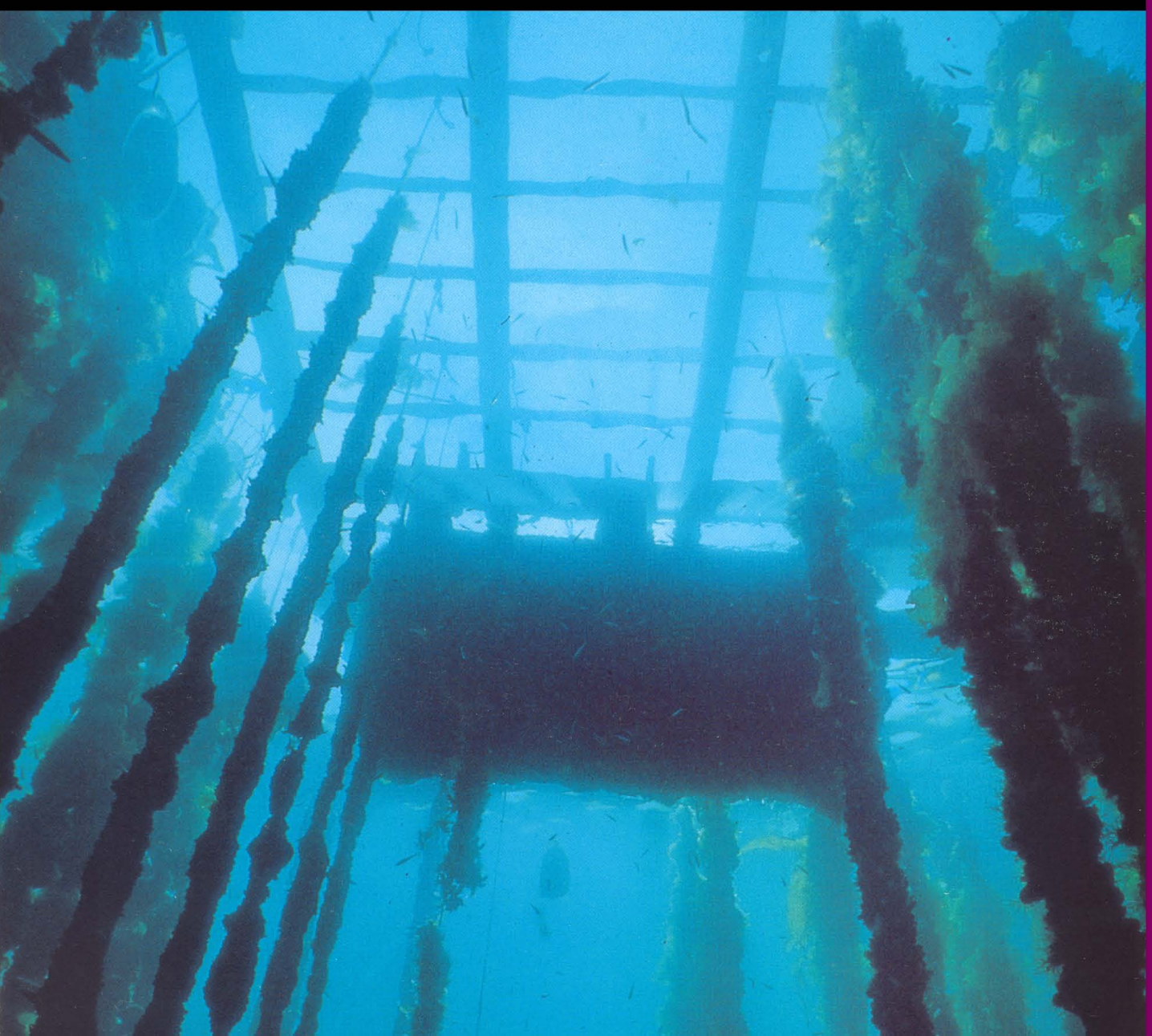
Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón

Sandra Santiago Rivas

Tesis Doctoral 2007
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Química

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología.
Facultad de Química

CONTRIBUCIÓN A LA DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE METALES TRAZA LIGADOS A LAS PROTEÍNAS SIMILARES A LAS METALOTIONEÍNAS EN MUESTRAS DE MEJILLÓN

Memoria presentada por Dña. **Sandra Santiago Rivas**
para optar al Grado de Doctor en Química

2007

Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía
E- 15872. Santiago de Compostela. España
Teléfono: 981591079

Dña. Pilar Bermejo Barrera, Catedrática de la Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, y **D. Antonio Moreda Piñeiro**, Profesor Titular del mismo departamento, ambos en la Universidad de Santiago de Compostela.

Informan:

Que la presente memoria titulada "Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón", que para optar al Grado de Doctor en Química presenta **Dña. Sandra Santiago Rivas**, se realizó bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizan a su presentación en la Comisión del Tercer Ciclo de la Universidad de Santiago de Compostela.

Fdo. Pilar Bermejo Barrera

Fdo. Antonio Moreda Piñeiro

Fdo. Sandra Santiago Rivas

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud en un primer lugar a la Consellería de Educación y la Consellería de Innovación Industria y Comercio por la concesión de las becas de tercer ciclo y predoctorales que he disfrutado, y que me han ayudado de algún modo a realizar este trabajo de investigación.

A la Consellería de Innovación Industria y Comercio por la concesión del proyecto de investigación "Estudio de la especiación y biodisponibilidad de Cr en agua, sedimentos y moluscos" en el cual se enmarca parte de este trabajo.

Al grupo de investigación Química Analítica Aplicada, del Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, por permitirme desarrollar a su lado y por colaborar en parte de esta tesis.

Al Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela, y al grupo de investigación de Pilar Bermejo, en especial a ella y a Antonio Moreda por ser mis tutores y orientadores durante todo este tiempo, a ti Antonio un millón de gracias por tu paciencia, comprensión y ayuda.

A toda la gente que ha pasado por el grupo de investigación durante mi permanencia en él, con los que he compartido charlas, risas, agobios y mismo lloros, de todos guardo algún buen recuerdo y de todos he aprendido algo aunque pareciese una tontería.

A mis amigas químicas Paloma, Paula Pazos, Paula Sanmartín, Lucía, Iria y Dolo, por el apoyo que me han brindado siempre en todos los aspectos no sólo en lo referido a lo académico, y porque ellas más que nadie saben el trabajo y esfuerzo que hay que realizar para llevar a cabo una tesis.

A Chris y a Sali por todo lo que han hecho por mí demostrándome su amistad cada día, gracias.

A Mónica y a Manuel porque algo triste hizo que nuestros caminos se reencontrasen y nos llevasen, estoy segura, a un futuro mejor.

A mis padres y a mis hermanos, Montse, Fani y Alberto, porque para mí lo son todo y sin los cuales nada tiene sentido.

A José Ángel, porque sin ti no hubiese sido capaz de escribir ni una sola línea, porque a tu lado soy y quiero seguir siendo feliz siempre.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

* AAS, Atomic Absorption Spectrometry
* AAS-STAT, Atomic Absorption Spectrometry - Slotled Tube Atom Trap
* AE, Anion Exchange
* AEC, Anion Exchange Chromatography
* AES, Atomic Emission Spectrometry
* ASE, Accelerated Solvent Extraction
* CE, Capillary Electrophoresis
* CE-ICP-MS, Capillary Electrophoresis - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* CMP, Capacity Microwave Plasma
* CVAAS, Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry
* DAD-ESI-MS, Diode Array Detector - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
* DCP, Direct Current Plasma
* DIN, Direct Injection Nebulizer
* DPV, Diferential Pulse Polarography
* DTNB, 5-5´Dithio-bis(nitrobenzoic acid)
* EE, Electroextraction
* ELISA, Enzyme - Linked Immunosorbent Assay
* EPA, Environmental Protection Agency
* ESE, Enhanced Solvent Extraction
* ESI, Electrospray Ionization
* ESI-MS, Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
* ETAAS, Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
* FAAS/FAES, Flame Atomic Absorption Spectrometry, Flame Atomic Emission Spectrometry
* FAAS-STAT, Flame Atomic Absorption Spectrometry - Slotled Tube Atom Trap
* FI, Flow Inyection
* FPLC-ICP(Q)MS, Fast Protein Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma(Quadrupolo) Mass Spectrometry
* FPLC-ICP(TOF)MS, Fast Protein Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma(Time of Fight) Mass Spectrometry
* HEN, High Efficiency Nebulizer
* HPHTSE, High Pressurized Hot Solvent Extraction
* HPLC, High Performance Liquid Chromatography

* HPLC-AAS, High Performance Liquid Chromatography - Atomic Absorption Spectrometry
* HPLC-Electrospray-MS, High Performance Liquid Chromatography – Electrospray - Mass Spectrometry
* HPLCfasereversa-ESI-MS, High Performance Liquid Chromatographyfasereversa - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
* HPLC-ICP-AES, High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
* HPLC-ICP-MS/OES, High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry / Optical Emission Spectrometry
* HPLC-MA-AAS, High Performance Liquid Chromatography – Microatomization - Atomic Absorption Spectrometry
* HPL-ICP-MS, High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* HPSE, High Pressurized Solvent Extraction
* HTWE, Hot Temperature Water Extraction
* HWE, Hot Water Extraction
* IAT, Integrated Atom Traps
* ICP, Inductively Coupled Plasma
* ICP-AES, Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
* ICP-DF-MS, Inductively Coupled Plasma - Double Focusing - Mass Spectrometry
* ICP-MS, Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* ICP-OES, Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
* ICP-Q-MS, Inductively Coupled Plasma – Quadrupolo - Mass Spectrometry
* ICP-TOF-MS, Inductively Coupled Plasma - Time of Fight-Mass Spectrometry
* LC, Liquid Chromatography
* LC-ICP, Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma
* LC-ICP-MS, Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* LOD, Limit of Detection
* LOQ, Limit of Quantification
* LPAT, Long Path Atom Trap
* MAE, Microwave Assisted Extraction
* MCN, Micro Concentric Nebulizer
* MIP, Microwave Inductively Plasma
* MLP, Metallothionein Like Protein

* mPC, membrane Preconcentration
* MS, Mass Spectrometry
* MT, Metallothionein
* NMWL, Nominal Molecular Weight Limit
* OCN, Oscillating Capillary Nebulizer
* PAH, Polyciclic Aromatic Hydrocarbons
* PBDD/DF, Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins/Dibenzofurans
* PBDE, Polybrominated Diphenyl Ethers
* PC, Principal Component
* PCA, Principal Components Analysis
* PCB, Polyciclic Chlorinated Biphenyls
* PCDD, Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins
* PFE, Pressurized Fluid Extraction
* PHSE, Pressurized Hot Solvent Extraction
* PHWE, Pressurized Hot Water Extraction
* PLE, Pressurized Liquid Extraction
* PSE, Pressurized Solvent Extraction
* RF, Reverse Phase
* RIA, Radioinmunoassay
* SBPM, Sustancias de Bajo Peso Molecular
* SCX, Strong Cation Schange
* SEC, Size Exclusion Chromatography
* SEC-ICP(DF)MS, Size Exclusion Chromatography - Inductively Coupled Plasma(Double Focusing)Mass Spectrometry
* SFE, Supercritical Fluid Extraction
* SLM, Supported Liquid Extraction
* SPE, Solid Phase Extraction
* SPE-HPLC, Solid Phase Extraction - High Performance Liquid Chromatography
* SSE, Subcritical Solvent Extraction
* STAT -FAAS, Slotled Tube Atom Trap - Flame Atomic Absorption Spectrometry
* STAT, Slotled Tube Atom Trap
* STWCAT, Slotled Tube Water Cooled Atom Trap
* SWE, Subcritical Water Extraction
* WCAT, Water Cooled Atom Trap

* μFI, micro Flow Inyection
* μFI-ICP-MS, micro Flow Inyection - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* μHPLC, micro High Performance Liquid Chromatography
* μHPLC-ICP-MS, micro High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
* μUSN, micro Flow Ultrasonic Nebulizer

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL 1

Índice 3

Bibliografía 47

CAPÍTULO I: OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ESPECTROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE MEJILLÓN 57

Índice 59

Introducción 61

Objetivo 89

Parte Experimental 93

Conclusiones 123

Bibliografía 127

CAPÍTULO II: OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE METALES LIGADA A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN MUESTRAS DE MEJILLÓN 133

Índice 135

Objetivo 137

Parte Experimental 141

Conclusiones 163

Bibliografía 167

CAPÍTULO III: ESPECIACIÓN DE LAS ISOFORMAS MLP-I Y MPL-II EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR HPLC Y DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN METÁLICA LIGADA A ÉSTAS POR HPLC-ICP-OES 171

Índice 173

Introducción 175

Objetivo 195

Parte Experimental 199

Conclusiones 229

Bibliografía 233

CAPÍTULO IV: OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN 239

Índice 241

Introducción 243

Objetivo 253

Parte Experimental 257

Conclusiones 297

Bibliografía 301

CAPÍTULO V: ESTUDIO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN DE MLPS 307

Índice 309

Introducción 311

Objetivo 319

Parte Experimental 323

Conclusiones 387

Bibliografía 391

CAPÍTULO VI: APLICACIONES A MUESTRAS DE MEJILLÓN DE BATEA DE LA RÍA DE AROUSA 397

Índice 399

Objetivo 401

Parte Experimental 405

Conclusiones 471

Bibliografía 475

CONCLUSIONES GENERALES 479

ANEXO 483

INTRODUCCIÓN GENERAL

ÍNDICE

1- METALES EN EL MEDIO AMBIENTE. CONTAMINACIÓN METÁLICA 5
2- TIPOS DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN METÁLICA. METALES TÓXICOS Y CONTAMINANTES MÁS FRECUENTES EN EL MEDIO AMBIENTE 6
3- IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE METALES A NIVEL TRAZA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICAS 9
4- METALES PRESENTES EN LOS SERES VIVOS 10
4.1- Metales ligados a las proteínas. Metalotioneínas 11
5- TOXICIDAD DE LOS METALES 15
6- BIOINDICADORES Y BIOMONITORES DE CONTAMINACIÓN METÁLICA 19
6.1- Los moluscos como bioindicadores. El mejillón 20
6.1.1- Morfología del mejillón 26
7- CULTIVO DEL MEJILLÓN 32
8- ÁREA DE ESTUDIO. RÍA DE AROUSA 37
8.1- Características generales de la costa gallega 37
8.2- La Ría de Arousa 40
9- LEGISLACIÓN 44
10- BIBLIOGRAFÍA 47

1- METALES EN EL MEDIO AMBIENTE. CONTAMINACIÓN METÁLICA

La existencia de metales en el medio ambiente de forma natural es debida a la presencia de éstos en cada una de las partes de las que consta la tierra, a saber, litosfera, hidrosfera, atmósfera y biosfera. Los ciclos biogeoquímicos de los diferentes elementos entre las diferentes esferas son el resultado de interacciones que ponen en juego tanto energía como materia, siendo las principales fuentes de energía la energía solar, la mecánica, la química y la termal producida por la propia tierra. Los elementos pueden así liberarse, transportarse y recombinarse siguiendo diferentes caminos de forma natural. La determinación de la concentración natural de los metales sirve como punto de referencia para estimar la contaminación producida por dichos elementos. Ésta no es fácil de obtener y así una de las formas que se suele utilizar es la realización de las medidas en áreas remotas como la Antártica o sobre materiales existentes antes de la industrialización **[1]**.

Podemos definir la polución como la contaminación deliberada o accidental del medio ambiente con residuos humanos. Otras definiciones más científicas son, por ejemplo, la dada por *Holister and Porteous* en su Diccionario del Medio Ambiente **[2]***: "Un contaminante es aquella sustancia que altera el medio ambiente por cambios en las rutas de crecimiento de las especies, interfiere en la cadena alimenticia, es tóxico, o interfiere en la salud, confort, comodidades o propiedades de la gente"*. En términos generales la polución causa degradación y daños en el funcionamiento natural de la biosfera. El daño causado se puede resumir en los siguientes puntos:

- Daños en la salud humana causados por sustancias químicas específicas presentes en el aire, comida y agua, y radioactividad.
- Daños en el medio ambiente con efectos en la vegetación, animales, suelo y agua.
- Daños en la calidad estética del medio ambiente causados por los humos industriales y el ruido, entre otros.
- Daños causados por contaminación a largo plazo, como los causados por sustancias que pueden ser absorbidas por el cuerpo durante largos periodos, por ejemplo sustancias carcinogénicas, radioactividad o ruido excesivo **[2]**.

2- TIPOS DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN METÁLICA. METALES TÓXICOS Y CONTAMINANTES MÁS FRECUENTES EN EL MEDIO AMBIENTE

Nos interesa principalmente la contaminación metálica producida por los denominados metales traza que son aquellos cuya concentración es inferior a 1 mg/l y producen efectos importantes. Podemos dividir las fuentes de contaminación en naturales y antropogénicas. Las fuentes naturales más relevantes son la erosión química de rocas metamórficas y los animales y plantas en descomposición. En cuanto a la presencia de metales en la atmósfera, las fuentes naturales que más contribuyen son las derivadas de procesos volcánicos, erosión de rocas, aerosoles y partículas procedentes de la superficie de los océanos **[3]**. Las fuentes antropogénicas más importantes van a ser las actividades relacionadas con la minería, fundición y refinado o aquellas que implican el vertido de aguas residuales de industrias siderúrgicas, de actividades domésticas o las relacionadas con la agricultura, tratamiento de superficies, curtidos, etc. Durante todas ellas se liberan metales al medio ambiente **[3, 4]** y asimismo también se liberan mediante la combustión de fósiles y carbón **[5]**. Por otro lado, durante la vida útil del metal, éste está sujeto a corrosión y desgaste, lo cual implica a su vez liberación al medio ambiente **[4]**. Los metales se dispersan, bien de forma natural o como ya se indicó anteriormente debido a actividades industriales, a través del aire, tierra y agua; pero la mayoría de los contaminantes metálicos terminan en las aguas superficiales y los que se emiten a la atmósfera acaban depositándose en la litosfera mediante la lluvia **[4, 6]**.

La persistencia de los metales en el medio ambiente es importante ya que no se degradan de ninguna forma. Es más, pueden transformarse en otras sustancias más tóxicas que las iniciales. Por ello es importante saber en que estado tanto físico como químico se encuentran los diferentes compuestos para poder estimar su biodisponibilidad **[4, 7]**. Cambios en el estado de oxidación de los metales pueden provocar importantes consecuencias medioambientales referentes a la contaminación. Así, en general la solubilidad de los metales es mayor en estados oxidados y en ambientes ácidos. A pHs más alcalinos y neutros se suelen adsorber sobre la superficie de partículas de $Fe(OH)_3$ insoluble o partículas de MnO_2 **[7, 8]**. Si nos encontramos en un sistema acuático, los elementos metálicos se depositarán en los sedimentos y producen procesos de coprecipitación. Las interacciones con los sedimentos pueden ser mediante varios procesos como la adsorción, cambio iónico y formación de complejos con el sedimento, fundamentalmente **[8]**.

El ciclo biogeoquímico natural de los metales se ve perturbado en muchas ocasiones por la acción del hombre. Esto viene produciéndose ya desde la Edad de Bronce aunque la extracción

de metales se ha incrementado enormemente desde la Revolución Industrial. Muchas veces la cantidad depositada de ciertos metales, como el Cd y el Hg, es más elevada a la que le correspondería con relación a la cantidad extraída, y esto se debe a que en muchos procesos de tratamiento de otros metales o de quema de carbón, se liberan trazas de estos elementos **[7]**. Los metales que presentan un efecto medioambiental mayor son los que presentan en la **tabla 1**.

Tabla 1: Metales pesados con mayor impacto medioambiental **[4, 6, 8]**

Cadmio	Níquel
Cromo	Plata
Cobalto	Estaño
Cobre	Zinc
Plomo	Lantánidos
Mercurio	Actínidos

Los metales traza se introducen en las aguas naturales formando parte de éstas. Los procesos de distribución están controlados por interacciones y equilibrios tanto dinámicos como físico-químicos. La solubilidad de estos metales en las aguas naturales se ve afectada por diferentes parámetros como son el pH, el tipo y concentración de ligando y agente quelatante, y el estado de oxidación de los componentes minerales. Se encuentran en este medio en forma suspendida, coloidal o soluble, normalmente en estado de ión libre coordinado por moléculas de agua **[3]**. Si se considera la distribución de las aguas superficiales, varios elementos presentan concentraciones bastantes elevadas en aguas costeras en relación con aguas oceánicas. Esto es debido, sobre todo, a que los elementos provienen principalmente de aportes de los ríos o de la difusión a partir de los sedimentos de la costa. Los mecanismos de eliminación son fundamentalmente dos, absorción por la biota y adsorción por las partículas suspendidas **[9]**. Los contaminantes de los sistemas acuáticos se pueden clasificar como se muestra en la **tabla 2 [10]**.

La atmósfera es considerada como la mayor fuente de metales a sistemas acuáticos. Los niveles de metales tanto en agua dulce como de mar se dividen en dos componentes: el metal presente en la parte filtrable, o sea, en la fase disuelta ($\leq$0,45 μm) y la materia suspendida. El que se encuentre en una u otra forma depende de factores ya citados, como el pH, las condiciones redox o la presencia de determinadas especies a las que se puedan complejar o ligar **[1]**.

Tabla 2: Clasificación de contaminantes de los sistemas acuáticos **[10]**

Contaminantes	**Inciden en**
Sedimentos	Calidad agua, eutrofización
Nutrientes	Calidad agua, eutrofización
Consumidores de O_2	Calidad agua, vida acuática
Patógenos	Salud
Metales	Salud, vida acuática
Petróleo	Vida acuática, estética
P. Orgánicos sintéticos	Vida acuática, salud
P. Inorgánicos y Minerales	Vida acuática, salud
Calor	Vida acuática
Materiales radioactivos	Salud
Sustancia, gusto, olor, color	Calidad agua, estética

3- IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE METALES A NIVEL TRAZA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICAS

Los elementos traza pueden ser clasificados en dos grupos: metales traza esenciales y metales traza no esenciales. El criterio más relevante que se utiliza para realizar esta clasificación es que la ausencia de un elemento esencial puede provocar una deficiencia específica que puede ser reversible al introducir el elemento en particular **[11]**. Muchos metales, incluyendo los denominados metales pesados, son considerados elementos traza esenciales para el perfecto desarrollo de los organismos, tanto plantas como animales. Por ejemplo, el Fe está presente en la formación de la hemoglobina de la sangre. Otros metales que intervienen en funciones biológicas son el Cu, Mn, Fe y Zn para plantas y animales, Co, Cr, Se y I para animales y B y Mo para plantas. Cuando se superan los límites de concentración necesarios, el metal pasa a tener un efecto tóxico sobre el organismo. Así pues, debe alcanzarse un equilibrio entre un exceso y un defecto en lo que se refiere a estos elementos esenciales **[3, 4, 12, 13]**. Los elementos no esenciales suelen denominarse en muchas ocasiones, y de forma errónea, metales tóxicos. Dentro de este grupo podemos incluir los siguientes metales: As, Cd, Hg, Pb, Pu, Sb, Tl y U, que son los que provocan efectos tóxicos cuando las concentraciones superan el límite de tolerancia del organismo, pero que no causan desórdenes de deficiencia a concentraciones bajas, como en el caso de los elementos esenciales **[12]**. Otros elementos como el Li, Al, F, y Sn, pueden ser considerados esenciales a niveles ultratraza. La ventana de esenciabilidad para muchos elementos es muy estrecha, así el Se fue considerado durante mucho tiempo como peligroso hasta que se descubrió su intervención en el funcionamiento de la enzima glutation peroxidasa. Muchos elementos como el Hg o el Cd, además de ser tóxicos, pueden alterar los niveles de concentración de los metales traza esenciales y de los metales esenciales ya que intervienen en procesos de competición de los sitios activos de moléculas que poseen importancia biológica **[13]**. Debido a todo esto es de relevada importancia la determinación de los elementos traza en muestras tanto biológicas como medio ambientales, para elucidar la relación entre los elementos químicos y los seres vivos, comprender el nexo entre el estado de salud y los problemas de exposición medioambiental y para realizar diagnósticos clínicos, entre otros **[11]**.

4- METALES PRESENTES EN LOS SERES VIVOS

El papel estructural y electrolítico de los elementos en los sistemas biológicos está muy bien estudiado y documentado. Como ya se ha indicado los metales traza esenciales, debido a sus bajas concentraciones, son de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de los organismos, no habiendo una clara proporcionalidad entre la baja cantidad de algunos elementos con su importancia vital. En muchas ocasiones éstos son constituyentes de moléculas biológicas vitales (Fe en la hemoglobina o I en las hormonas tiroideas) y en otros casos forman parte de un sistema enzimático o ejercen su influencia como cofactores en varias reacciones mediadas por ciertos enzimas. Los efectos sobre la salud de los elementos traza se basan en manifestaciones a través de síndromes relacionados con su deficiencia o exceso. Las principales causas de deficiencia o exceso están relacionadas con la dieta, con la exposición a contaminantes antropogénicos y a la alteración de las demandas fisiológicas debidas al embarazo y lactancia **[11]**.

Los metales traza van a presentar fundamentalmente tres funciones en los organismos; estructural, de formación de metaloenzimas (aquí la función que desempeñan es catalítica), y por último, función reguladora **[14, 15]**. Los efectos fisiológicos de estos metales van a venir determinados, fundamentalmente, por la posición específica de estos elementos en sitios de unión concretos **[14]**.

Una de las características principales que presentan muchos metales pesados es su afinidad por los grupos sulfuro. Muchas proteínas se caracterizan por presentar una o más unidades moleculares que contienen grupos sulfuro, o lo que es lo mismo, aminoácidos de tipo cisteína. También existen numerosos enzimas ricos en grupos cisteína y sulfuro. Estos átomos de azufre pueden estar unidos a través de dos tipos de enlace, enlaces de tipo sulfidrilo, o sea, unión S-H, o enlaces de tipo disulfuro, o sea, enlace S-S. Muchos metales pueden unirse al átomo de S alterando de esta forma la funcionalidad de éste, tanto en los enlaces sulfidrilo como en los disulfuro **[16, 17]**. Así, los grupos sulfidrilo, presentes en muchos enzimas que controlan la velocidad de las reacciones metabólicas críticas en el cuerpo humano, se enlazan fácilmente a los cationes metálicos ingeridos o a las moléculas que contienen metales. Esto hace que la enzima no pueda actuar de forma normal y que la salud se vea afectada adversamente **[17]**.

4.1- METALES LIGADOS A LAS PROTEÍNAS. METALOTIONEÍNAS

Como ya se ha comentado los iones metálicos juegan un papel importante tanto en la estructura y función de muchas proteínas, como en los aspectos relacionados con la cristalografía de éstas. A estos tipos de proteínas se les denomina metaloproteínas por la presencia de metal en su composición y sus funciones principales van a ser:

1. Estructural: El ión metálico es necesario para la correcta conformación de una región proteica y tiene una función reguladora.
2. Transporte y almacenaje.
3. Transferencia de electrones: El ión metálico sirve como centro redox para transferir, almacenar o aportar electrones. El potencial redox del ión metálico viene definido por la proteína.
4. Enlace con el O_2: La molécula de hemoglobina es un claro ejemplo, aunque existen otras metaloproteínas que no contienen el grupo hemo.
5. Catalítica: Interviniendo en el desarrollo de estados de transición, de activación de sustratos entre otros **[5]**

Los principales iones metálicos presentes en las metaloproteínas son el Fe (citocromos, transporte de oxígeno, enzimas), Zn (insulina, anhidrasa carbónica), Cu (oxidoreductasas) y Mn (enzimas glicolíticas y proteasas). Dentro de las metaloproteínas cabe destacar las metalotioneínas. Este tipo de proteínas destaca por su alto contenido en grupos sulfidrilos y son metaloproteínas de tipo citoplasmático que se encuentran en todos los vertebrados, invertebrados (llamándose en este caso proteínas similares a las metaloproteínas, MLP, *metallothionein like proteins*) y en hongos. Las células de los mamíferos sintetizan dos isoformas MT-I y MT-II. Cada metalotioneína está formada por 61 aminoácidos de los cuales 20 son de tipo cisteína, destacando la ausencia de puentes disulfuro **[18]**. Se han llegado a elucidar dos isoformas más la MT-III y la MT-IV **[19, 20]**, presentes en la lengua y en el cerebro de mamíferos. Las diferentes isoformas se diferencian por el punto isoeléctrico y la hidrofobidad que presentan **[21-23]**, ya que se distinguen por poseer algún aminoácido extra que puede variar en número de 1 a 15. Por ello, este tipo de proteínas se pueden separar mediante cromatografía de intercambio iónico **[22-29]**. En los mamíferos, cada isoforma presenta dos dominios, denominados α y β. El primero está formado por 11 residuos de cisteína y uniones a cuatro átomos de Cd y cuatro átomos de Zn, mientras que el segundo contiene 9 residuos de cisteína, tres átomos de Cd y otros tres de Zn **[30-34]**. El clúster α corresponde con el dominio

C-terminal y el β con el N-terminal **[31, 35-38]**. La secuencia de aminoácidos es Cys-X-Cys, Cys-Cys, Cys-XY-Cys, donde XY van a ser aminoácidos diferentes a la cisteína **[39]**. La acumulación de metalotioneína está inducida por la presencia de Zn, Cu, Hg y Cd, principalmente **[18]**.

Las metalotioneínas se pueden clasificar en tres grupos:

I. MTs aisladas de los mamíferos que incluye a todos los polipéptidos que presenten las siguientes características: alto contenido de metales pesados (4-12 átomos), unidos a las proteínas por enlaces de tipo tiol y formando dos agrupamientos o dominios metálicos. Alto contenido en cisteína (del 23-33%) con una localización constante en la secuencia primaria de los aminoácidos de la proteína, y ausencia de aminoácidos hidrófobos y aromáticos. Bajo peso molecular, inferior a 10 D.
II. MTs que presentan una distribución de aminoácidos cisteína que no se corresponde con la localización de las cisteínas en las MTs de la clase I. Éstas han sido encontradas en organismos eucariotas unicelulares, como las levaduras, y en ciertos procariotas como las cianobacterias.
III. MTs de estructura de polipéptidos formados por la repetición de 2 a 11 unidades glutamil-cisteinil, y reciben el nombre de fitoquelatinas cuando el aminoácido carboxilo terminal es una glicina **[30, 40]**

En las **figuras 1** y **2** podemos ver las uniones del Cd y del Zn en las MTs.

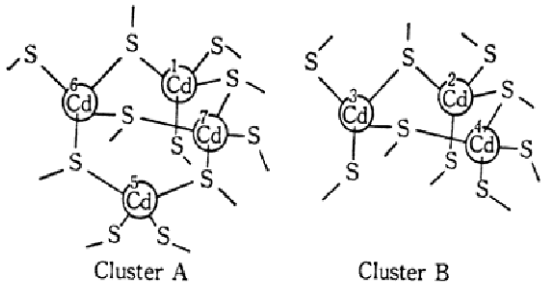


Figura 1: Estructura de las uniones de Cd a la metalotioneína **[41]**

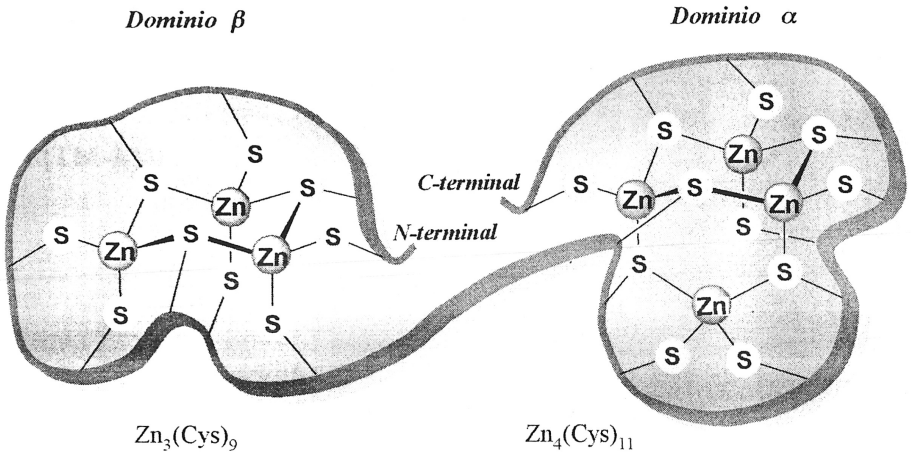


Figura 2: Tipos de cúmulos metálicos existentes en la MT de los mamíferos **[42]**

De lo expuesto anteriormente, podemos definir a las metalotioneínas como proteínas de bajo peso molecular, que se caracterizan por un alto contenido en cisteína y una capacidad selectiva para unirse a metales pesados como el Zn, el Cd y el Cu **[9, 43]**. El orden de afinidad de menor a mayor entre los residuos de cisteína que se van a unir con los diferentes metales es Zn(II)<Pb(II)<Cd(II)<Cu(I), Ag(I), Hg(II), Bi(III) **[34, 39, 44, 45]**. Como ya se explicó, existen dos isoformas, la MT-I y la MT-II, clasificación basada en propiedades electroforéticas. Este tipo de proteínas están presentes en el hígado y en el riñón de forma natural. Constituyen el mayor almacén de elementos esenciales como el cobre y el cinc. Si el nivel de estos elementos es alto en el organismo, se produce la transcripción de los genes de las MTs y sintetizándose muchas de ellas para unirse a estos metales. Por ello son detoxificantes de metales. Cuando la concentración de estos metales es baja, las MTs son rápidamente degradadas. Más del 50% del Zn y del 25% del Cu están asociadas a las MTs. La estructura de las MTs ha sido estudiada por técnicas tanto biofísicas como bioquímicas como pueden ser la espectrometría ultravioleta, la espectrometría de resonancia magnética nuclear o la espectrometría de difracción de rayos X **[43]**.

Otras propiedades intrínsecas de las MTs son la resistencia a la termocoagulación y a la precipitación ácida **[46, 47]**. Se pueden purificar mediante filtración en gel o por cromatografía de cambio iónico. El contenido de metal varía con la especie y el órgano origen de la proteína, además de las condiciones de inducción. Así, en general las metalotioneínas en el hígado tienden a contener sólo Zn, mientras que las del riñón contienen Cd y Zn **[41]**.

Las principales actividades en las que participan son reacciones inmunológicas, detoxificación de metales, catálisis en reacciones no enzimáticas y participación en los procesos de metabolismo de los metales pesados como procesos de absorción, transporte y almacenamiento. Participan también en la homeostasis de Cu y Zn, en el transporte y eliminación de Cd y Zn y en la protección contra los procesos oxidativos que se pueden causar **[20, 23, 41]**.

Las metalotioneínas se utilizan como bioindicadores de contaminación medioambiental de tipo metálica, sobre todo debida a Cd, Hg y Zn. Las medidas de contenido intracelular de metal unido a metalotioneína sirven para hacer una estimación indirecta de la polución. Como ya se ha indicado, el metal absorbido por el organismo se une a la metalotioneína. Esta unión provoca la transcripción del ácido ribonucleico mensajero, o sea, se induce la síntesis de más metalotioneína unida a metal **[34, 47-50]**. La inducción de metalotioneínas es, por tanto, una respuesta protectiva para reducir la concentración de contaminantes libres presentes en las células, ya que presentan la capacidad de unirse a los iones metálicos eliminándolos del medio cuando la presencia de éstos es elevada **[13]**.

Las MTs se encuentran en la mayoría de los grupos animales estudiados, sobre todo en invertebrados como los moluscos, bivalvos y gasterópodos; también en artrópodos como los insectos y los crustáceos; así, van a ser bioindicadores de tipo marino principalmente **[34, 47-52]**.

5- TOXICIDAD DE LOS METALES

Podemos clasificar las sustancias tóxicas de varias maneras. Así, hay clasificaciones que se basan en el órgano blanco del tóxico (hígado, riñón…), según el uso (pesticidas, disolventes, aditivos alimenticios), según los efectos que causen (cáncer, mutaciones…), según el estado físico (gas, partícula, polvo), según su química (hidrocarburo halogenado, amina aromática….). También se pueden clasificar según el mecanismo biológico de actuación. Lo que deben tener en consideración todas las clasificaciones posibles son tanto las propiedades químicas como las biológicas de los agentes tóxicos, así como las características de exposición **[53]**.

En nuestro caso, nos van a interesar las sustancias tóxicas que implican la presencia de metales en su actuación.

La toxicidad se define como la habilidad de un compuesto químico o físico para causar daños sobre un ser vivo. Por otro lado, se dice que una sustancia es peligrosa si es probable que cause lesiones bajo ciertas circunstancias de uso. Las exposiciones a sustancias tóxicas pueden ser de varios tipos. Atendiendo a su evolución en función del tiempo las exposiciones se clasifican en agudas, subcrónicas y crónicas. Las exposiciones agudas son exposiciones de poca duración donde las sustancias son absorbidas por inhalación, por vía cutánea o por ingestión. Las exposiciones subcrónicas son aquellas en las que el tiempo medio de exposición es sobre 90 días. Finalmente, las exposiciones crónicas son exposiciones de larga duración. También pertenecen a este último grupo aquellas exposiciones repetidas con duración de días, meses o años **[54, 55]**.

Para medir la toxicidad de una sustancia se utiliza la denominada dosis letal media (LD_{50}), que es un estimado estadístico de la cantidad de una sustancia química necesaria para provocar la muerte del 50% de una población dada o de animales test **[54]**.

Las diferentes vías de entrada de los metales en los organismos se basan en mecanismos de absorción, entendiendo como absorción la transferencia de una sustancia química desde el sitio de exposición hacia la circulación sistémica **[56]**. Las distintas vías de absorción son:

a) Inhalatoria, por este mecanismo los metales pueden ser inhalados en forma de partículas, gas o vapor, bien en forma elemental o como combinaciones inorgánicas u orgánicas, generalmente más tóxicas que el metal en forma elemental.

b) Vía dérmica; los metales en forma particulada, gas, vapor o en disolución, pueden absorberse a través de la piel y pasar a vía sistémica o ser retenidos localmente.
c) Vía oral; por ingestión de bebidas o alimentos contaminados. Esta es la vía más frecuente en general.
d) Otra vía de relevada importancia es la relacionada con los tratamientos de diálisis y por el uso de prótesis metálicas, tratamientos que pueden ceder iones.
e) Por último, son importantes dos vías de exposición para el feto, las referidas a la transferencia placentaria y a la leche materna, ya que a través de la placenta pasan metales y también algunos son segregados en la leche materna **[57]**.

Dicha absorción puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos, la difusión simple (para combinaciones orgánicas) o mediante portadores especiales (para compuestos inorgánicos). Una vez introducidos en los organismos los elementos se transportan unidos a la fracción macromolecular de las proteínas plasmáticas, mediante enlaces con grupos funcionales como sulfidrilos, amino, fosfatos, carboxilato, imidazol e hidróxido. La distribución depende de la facilidad con la que atraviesen las membranas y de la afinidad con los componentes de órganos y tejidos **[57]**. Las rutas que pueden seguir son principalmente las siguientes:

I. Metabolización en otros compuestos, generalmente menos tóxicos que el componente original.
II. Almacenamiento en determinados tejidos.
III. Eliminación del contaminante y sus metabolitos **[9]**.

Los mecanismos de toxicidad de los iones metálicos son el bloqueo de grupos o biomoléculas cuyas funciones biológicas son esenciales, desplazamiento de iones metálicos esenciales y la modificación de la conformación activa, ambos hechos sobre las biomoléculas **[3]**.

Las vías principales de eliminación de compuestos inorgánicos, como los elementos metálicos, son la renal y la gastrointestinal, siendo la más frecuente la renal, mediante uniones a moléculas como la albúmina o la metalotioneínas. Si se elimina mediante el tracto gastrointestinal, la ruta de eliminación es mediante la bilis. Otras rutas pueden ser mediante el sudor, la secreción salivar, el aliento, el pelo y las uñas **[57]**.

Una vez que un elemento se encuentra presente en un determinado organismo de un nivel

trófico inferior, dicho elemento puede pasar a otro organismo superior en la escala trófica, de modo que lo normal es que se encuentren concentraciones más elevadas en los niveles tróficos superiores. Así, estudios realizados sobre sistemas acuáticos revelan que las concentraciones de elementos contaminantes son mayores en los peces que en los organismos inferiores del medio acuático **[17, 58]**. El hecho de que el nivel de los contaminantes metálicos sea mayor en los miembros superiores de la cadena trófica que en el aire o agua contaminados, puede ocasionar que plantas o animales lleguen a constituir un peligro para la salud al ser utilizados éstos como alimentos **[4]**.

El término que se utiliza para definir el proceso de acumulación de un contaminante en un organismo o una comunidad biológica debida a la captación directa desde el agua o por ingestión, es el denominado bioacumulación **[58]**. Por otro lado, vamos a definir la bioindicación como el reconocimiento y determinación de los cambios ambientales, naturales o inducidos por el Hombre, a través de la biota. Este proceso es dependiente del tiempo y se caracteriza por respuestas sensitivas medibles en objetos y sistemas biológicos. Dentro de la bioindicación se puede distinguir entre biomonitorización, cuando la determinación del efecto es cuantitativa, y bioindicación cuando el control es cualitativo. Los organismos que se van a utilizar para el reconocimiento y cuantificación de los diferentes factores son los denominados biomonitores que pueden ser de dos tipos:

1. *Sensitivos:* Su utilización se basa en biomonitorizaciones visuales (cambios en el comportamiento, aspecto morfológico...) y en biomonitorizaciones fisiológico-bioquímicas (actividad enzimática...). Se suelen emplear en sistemas acuáticos.
2. *Acumuladores:* Caracterizados por la capacidad corporal de acumulación del elemento sometido a estudio. **[59]**

También se pueden clasificar como biomarcadores de exposición o de efecto, siendo los primeros aquellos que indican la exposición de un organismo a una sustancia química pero que no dan información acerca de los efectos adversos o cambios que causa en los organismos; y los segundos, los que si lo demuestran **[13]**.

La biomonitorización puede ser de dos tipos; activa y pasiva. La primera consiste en la exposición controlada de organismos o comunidades en condiciones de campo, esto es, *in situ*, mediante técnicas de transplante o en condiciones de laboratorio, *in vivo*. En la pasiva, los

organismos o comunidades son autóctonos de la zona de estudio **[59]**.

La parte de bioacumulación resultante del reparto del contaminante entre las fases acuosas y biológicas recibe el nombre de bioconcentración. Así mismo cuando la bioacumulación se produce por ingestión se habla de biomagnificación **[58]**.

6- *BIOINDICADORES Y BIOMONITORES DE CONTAMINACIÓN METÁLICA*

Los efectos ecoxitológicos de la polución pueden ser valorados estudiando los ecosistemas afectados por éstos. Dichos efectos van a ser:

- Cambios en la composición y dominancia de las especies en las comunidades ecológicas.
- Cambios en la diversidad de especies en las comunidades.
- Incremento de las rutas de mortalidad en las poblaciones.
- Cambios fisiológicos y morfológicos en los individuos.
- Incremento de los contaminantes o de sus metabolitos en los tejidos de los individuos **[12, 60]**.

Se han utilizado numerosas especies de fauna y flora como bioindicadores de los cambios medioambientales. Podemos definir a un indicador biológico como aquel organismo que acumula sustancias en sus tejidos, reflejando de este modo los niveles de estas sustancias en el medio ambiente **[61]**. También se puede definir como la respuesta biológica a una o más sustancias químicas que nos proporciona una medida sobre la exposición y a veces información sobre los efectos tóxicos **[13]**. Estos bioindicadores para poder ser tratados como tal tienen que poseer una serie de características particulares como son:

- Poder ser identificados rápidamente
- Fácilmente muestreables y cuantificables
- De distribución cosmopolita
- De acumulación rápida de contaminantes
- De cultivo fácil en laboratorio
- Que presenten baja variabilidad

Nos vamos a encontrar así con numerosos bioindicadores como van a ser los protozoos, las algas o los peces, entre otros. Por otro lado existen numerosos factores que van a influir en la acumulación por parte de las especies bioindicadoras, como son las rutas de acumulación y excreción, las condiciones fisiológicas, la edad y el tamaño y las variables medioambientales **[61]**.

Así, numerosos estudios utilizan a los denominados biomarcadores para elucidar la cantidad de las sustancias químicas en los diferentes pasos de la polución. Mediante esta técnica la

medida de la concentración de un contaminante se realiza sobre unas determinadas especies (como ratas, ratones, lombrices y otros organismos) o hábitats que son normalmente colocadas de forma deliberada para la medida de la exposición biológica **[3]**.

Debido a la capacidad acumuladora de contaminantes presentes en disolución o particulados que muestran los organismos marinos, va a ser importante el papel de estos como bioacumuladores en este medio. Con el objeto de obtener información acerca de la biodisponibilidad de los contaminantes en los sistemas acuáticos, se han propuesto una serie de biomonitores que presentan los requisitos necesarios para poder ser utilizados como tal. De este modo nos encontramos con:

- Algas macrófitas, que responden esencialmente a fuentes de contaminantes en disolución. Entre ellas se encuentran las pertenecientes a la familia de *Fucus*, *Ascophyllum nudosum*, *Enteromorpha sp*, *Ulva sp* y *Sargassum sp*.
- Filtradores suspensívoros, que responden a contaminantes en fase disuelta o suspendida. Aquí es importante señalar la utilización del mejillón *Mytilus edulis* y *galloprovincialis* en zonas de aguas templadas y *Perna* en zonas tropicales.
- Detritívoros, comedores de depósitos recientes sobre el sedimento, como pueden ser crustáceos como el camarón o el cangrejo **[59]**

6.1- LOS MOLUSCOS COMO BIOINDICADORES. EL MEJILLÓN

La utilización de moluscos para determinar la contaminación metálica en zonas costeras, está ampliamente extendida. El uso de éstos para tal fin se debe principalmente a que su distribución geográfica es muy amplia, son fáciles de recolectar y resistentes a altas concentraciones de metal **[48]**. Del interés mostrado desde 1970 por el estudio de los bivalvos como sistemas bioindicadores resultó el *Mussel Watch Program*, en el cual se trabaja con mejillones y otros bivalvos como indicadores de la polución medioambiental en costas y estuarios **[62]**. Mediante este programa se pueden conocer qué contaminantes están presentes, dónde y en qué concentración, en diferentes partes del mundo **[13]**. La tolerancia que muestran los mejillones a determinados agentes contaminantes ha llevado a que sean considerados como una especie casi indiferente frente a éstos, ya que consiguen vivir en zonas sometidas a poluciones importantes, llegándose a encontrar en su interior, en algunos casos, bacterias como la salmonella, la disentería

o el virus de la hepatitis. Son capaces de acumular hidrocarburos como el petróleo, sin que esto les provoque un mal considerable y acumulan también sustancias de tipo radiactivo. Suelen acumular metales pesados como As, Fe, Co, Cd, Mn, Zn, Hg sobre todo en el riñón, sin que en un principio le provoquen una toxicidad acusada **[63]**. Por todo lo expuesto anteriormente, es muy recurrido su uso como bioindicador.

Es necesario indicar que se han realizado muchos estudios con mejillones como bioindicadores. Así podemos citar el trabajo presentado por *Etxeberria et al.* **[64]**, sobre los cambios en los lisosomas digestivos de los mejillones utilizados como bioindicadores medioambientales del estuario de Urdaibai. En este estudio se comprueba que debido a la presencia de distintos tipos de contaminantes, hidrocarburos, metales..., parámetros como el tamaño y volumen de los lisosomas del mejillón varían. *Locatelli* **[65]** propuso nuevos procedimientos analíticos y mineralizaciones ácidas de la muestra de mejillón, almeja y pescado, para determinar Cd, Pb, Cu y Zn por voltamperometría diferencial de impulsos (DPV, *Differential Pulse Voltammetry*) y Hg por espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS, *Cold Vapour Absorption Atomic Spectrometry*). *Tahán et al.* **[66]**, estudiaron la concentración total de Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb, y Zn en mejillones mediante espectrometría de absorción y emisión atómica de llama (FAAS/FAES, *Flame Absorption Atomic Spectrometry / Flame Emission Atomic Spectrometry*), CVAAS y atomización electrotérmica (ETAAS, *Electrothermal Absorption Atomic Spectrometry*) después de realizar mineralizaciones ácidas inducidas con radiación de microondas. Estos autores encontraron altas concentraciones de metal en moluscos, concretamente Pb en mejillones y Cr en almejas. *McLaren y Wheeler* **[67]** determinaron, entre otros, Cr, Al, Cu, Pb y Zn, en mejillones mediante ETAAS con introducción directa de la muestra sólida; mientras que *Storelli et al.* **[68]**, determinaron 6 metales, entre ellos el Cr, en mejillón procedente de la costa italiana, usando ETAAS después de realizar una digestión ácida. *Miller* **[69]**, utilizó también los mejillones como bioindicadores de contaminación metálica de una zona costera de Escocia, indicando que son buenos indicadores de la contaminación por Cr, Cd, Pb y Hg, moderados para el Ni y pobres para el Cu y el Zn.

Otros análisis multielementales que usan como matriz al mejillón, y como técnicas de determinación ETAAS y FAAS, emplean un tratamiento de la muestra con HNO_3, H_2O_2 y HCl en ultrasonidos a temperatura ambiente, comparando los resultados obtenidos con los adquiridos mediante plasma acoplado por inducción y espectrometría de emisión óptica (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Espectrometry*) después de realizar una digestión

de la muestra con energía de microondas **[70, 71]**. También, se han empleado herramientas quimiométricas como el análisis de componentes principales para diferenciar mejillones contaminados de los que no lo están **[72]**.

Otros trabajos se basan en el estudio de la eficiencia de asimilación de metales como Cd, Cr (Cr(VI)), Se (Se(IV)), Ag, Co, Am, Pb y Zn, en la fase disuelta por parte del mejillón, llegando a la conclusión de que la biodisponibilidad del metal en la fase acuosa está relacionada con las características fisiológicas del animal **[62, 73]**.

Muchos trabajos recientes utilizan los moluscos como bioindicadores del contenido total de metal **[74-78]**. No obstante, ciertos productos, sintetizados en los organismos como consecuencia de eventos tóxicos, pueden ser medidos para el estudio de la exposición a contaminantes y sus posibles efectos tóxicos crónicos. Estas características moleculares, denominadas biomarcadores, se pueden definir como la respuesta biológica a la química medioambiental y pueden estar presentes a nivel molecular, celular o en todo el organismo. Existen numerosas respuestas biológicas, como la estabilidad de la membrana lisosomal **[79]**, la actividad de ciertas enzimas como la glutatión-S-transferasa **[80]**, glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa y acetilcolinesterasa **[81]**, los niveles de sustancias reactivas de tiobarbitúricos **[80]**, los niveles de estrés-70 **[82]** y los niveles metalotioneínas **[79-81, 83, 84]**, todos ellos han sido utilizados como biomarcadores de metales pesados.

El nivel de proteínas similares a las metalotioneínas en los mejillones no sólo se va a ver modificado por el nivel de metales presentes sino que van a influir otros parámetros como la temperatura, la salinidad, o la concentración de oxígeno. El hecho de que la concentración de proteínas similares a las metalotioneína en los tejidos del mejillón varíe en respuesta a las fluctuaciones de los parámetros medioambientales hace que su estudio en moluscos esté muy extendido **[39]**.

Si nos referimos al estudio de metales asociados a proteínas similares a las metalotioneínas del mejillón, se pueden citar los trabajos de *High et al.* **[47]** en cuanto a la caracterización físico-química de los enlaces metal-proteína usando técnicas acopladas como cromatografía líquida de alta resolución-plasma acoplado por inducción - espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS, *High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*), cromatografía líquida de alta resolución – microatomización - espectrometría de

absorción atómica (HPLC-MA-AAS, *High Performance Liquid Chromatography - Microatomization - Absorption Atomic Spectrometry*) y cromatografía líquida de alta resolución – electrospray - masas (HPLC-Electrospray-MS, *High Performance Liquid Chromatography - Electrospray -Mmass spectrometry*). *Ferrarello et al.* **[48, 52]** determinaron las fracciones de Cd, Zn y Cu en un caso y Cu, Zn, Ca, U, Ni, Mo, Mn, Cr, V, Cd, Al y Sb en otro, ligados a las proteínas similares a las metaloproteínas de los mejillones tipo *Mytilus edulis* recolectados de tres zonas costeras de España, usando para ello HPLC-ICP-MS. Asimismo, estudiaron las interacciones del Se con las proteínas similares a las metalotioneínas y la eficiencia detoxificadora de las mismas con respecto al Cd en presencia y ausencia del Se **[85]**. Otras investigaciones realizadas por estos autores comparan la determinación de los metales traza ligados a metalotioneínas y a proteínas similares a las metalotioneínas por diversas técnicas instrumentales como la cromatografía de exclusión por tamaños y plasma acoplado por inducción de doble focalización - espectrometría de masas (SEC-ICP(DF)MS, *Size Exclusion Chromatography - Inductively Coupled Plasma (Double Focusing) Mass Spectrometry*), cromatografía líquida rápida de proteína - plasma acoplado por inducción de cuadrupolo - espectrometría de masas (FPLC-ICP(Q)MS, *Fast Protein Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma (Quadrupole) Mass Spectrometry*), y cromatografía líquida rápida de proteína - plasma acoplado por inducción de tiempo de vuelo - espectrometría de masas (FPLC-ICP(TOF)MS, *Fast Protein Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma (Time of Flight) Mass Spectrometry*) **[86]**. *High et al.* **[34]** indujeron la síntesis de metalotioneínas y proteínas similares a las metalotioneínas en presencia de Cd, para cuantificar la cantidad de este tipo de proteínas en diferentes muestras, entre ellas mejillón, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a plasma acoplado por inducción – espectrometría de masas (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*) o ICP-OES. Observaron que la presencia de 2-mercaptoetanol facilitaba la unión del Cd a la metalotioneína, pero esto no se observaba para el Cu ni para el Zn. También se ha usado cromatografía de cambio iónico y plasma acoplado con inducción–tiempo de vuelo–espectrometría de masas (ICP-TOF-MS, *Inductively Coupled Plasma – Time of Flight - Mass Spectrometry*), para realizar multiespeciación y ver que tipo de metales aparecen unidos más frecuentemente a las metalotioneínas o a las biomoléculas de alto peso molecular presentes en los mejillones. Así se encontró que el Cd, Cu, Zn, Hg y Ag, son los que con más frecuencia se asocian a este tipo de metaloproteínas, mientras que Pb, Sn y U aparecen unidos a otras biomoléculas de mayor peso molecular, y el Cr, Co, Ni, Sn y V presentan picos de elución próximos a la zona de las metalotioneínas **[50]**. *High et al.* **[87]** también caracterizaron las metalotioneínas unidas al Cd en los mejillones tipo zebra, mejillones que viven

en aguas dulces o de baja salinidad. El incremento de la población de esta especie está teniendo un impacto medioambiental negativo ya que reduce los niveles de partículas suspendidas de las que se alimentan otros organismos. La caracterización se realizó mediante HPLC-MA-AAS y HPLC-ICP-MS. *Raspor et al.* **[88]** estudiaron si la glándula digestiva del mejillón *Mytilus galloprovincialis* era un tejido adecuado para estimar la contaminación de Cd por las proteínas similares a las metalotioneínas presentes, llegando a la conclusión de que no lo era, y viéndose que aunque la acumulación del metal tóxico ocurre de diferente forma según el área estudiada, estas diferencias no se ven reflejadas en los niveles de proteína. *Dragun et al.* **[83]** investigaron los niveles de metal ligado a las proteínas similares a las metalotioneínas presentes en las branquias de mejillones *Mytilus galloprovincialis*. De este trabajo se deduce que nos podemos encontrar con dos grupos de metales según la fase en la que se encuentren en el momento de ser captados por el mejillón. Así el Zn y el Cd estarán en la fase disuelta y el Cu, Mn y Fe en la particulada. También se observa que las variaciones temporales de las proteínas similares a las metalotioneínas dependen de la variación de las branquias que a su vez se ven influenciadas por las diferentes estaciones y por la cantidad de alimento disponible. *Irato et al.* **[89]** estudiaron la concentración de metal unido a las proteínas similares a las metalotioneínas presentes en las branquias y en las glándulas digestivas de mejillones tipo *Mytilus galloprovincialis* y almejas de tipo *Scapharca inaequivalvis* y *Tapes philippanarum*, de la laguna de Venecia. Observaron que los mejillones acumulan más metal en las glándulas digestivas, principalmente Mn, Zn y Cd.

Otros trabajos se basan en el estudio de la secuencia de proteínas de las diferentes isoformas que presentan las proteínas similares a las metalotioneínas, en las diferentes clases de mejillones que forman la familia Mytilidae. Así se trabaja con mejillones de tipo *Bathymodiolus thermophilus*, (comunes en el Océano Pacífico), y con mejillones de tipo *Bathymodiolus azoricus* presentes en el océano atlántico, ambos en áreas de características hidrotermales donde hay una concentración de metales elevada, altos niveles de sulfuro de hidrógeno y bajos pHs. Dichas secuencias se comparan con las que presentan los mejillones tipo *Mytilus edulis* y *Perna viridis*, mejillones presentes en áreas costeras, viéndose que estas secuencias muestran bastante similitud entre clases **[90]**. Asimismo, existe bibliografía en la cual se comparan la información genómica presente en la isoforma MLP-I de dos especies diferentes de mejillón, la *Mytilus edulis* (presentes en la costa) y la *Bathymodiolus thermophilus* (presentes en áreas hidrotermales) **[91]**. Otros trabajos tratan de elucidar el incremento de una de las dos isoformas tras la exposición a los diferentes metales, de esta forma la transcripción del ARN mensajero para producir MLP-II es específico de la presencia de Cd, mientras que en presencia del Zn se produce la respuesta de los

genes de MLP-I **[92]**.

Existen trabajos en los que se ha estudiado la influencia de la temperatura y del tamaño del mejillón en la síntesis de proteínas similares a las metalotioneínas en las branquias de mejillón de tipo *Mytilus galloprovincialis*, tras la exposición a Cd. Se encontró que el tamaño está relacionado con el incremento de temperatura a la hora de sintetizar dichas proteínas. Así, los individuos de mayor tamaño sintetizaban más proteínas similares a las metalotioneínas a temperaturas elevadas que los pequeños. Por otro lado, se sintetizan más proteínas similares a las metalotioneínas a altas temperaturas que a bajas **[93]**. También se ha estudiado si los cambios relacionados con las estaciones afectaban a la síntesis, tanto en las branquias como en la glándula digestiva, inducida por la presencia de metales en mejillones de tipo *Mytilus edulis*. Para ello se trabajó con individuos que eran de la misma población, sólo que una parte de éstos se llevaron a otra zona con mayor concentración metálica. Las conclusiones obtenidas fueron que, con respecto a la concentración de proteínas similares a las metalotioneínas, no había una tendencia temporal clara en la concentración de las mismas presentes en las branquias, pero sí en la presente en la glándula digestiva, sobre todo en los mejillones que se habían transplantado. También se encontró que la concentración de proteínas similares a las metalotioneína en la glándula digestiva dependía del lugar de crecimiento del mejillón y que tanto la concentración del metal como de proteína era independiente del tamaño del mismo **[94]**. *Dalin Shi et al.* investigaron cómo se podía modificar la acumulación de metales como el Ag, Cd, Cu y Zn tras la exposición previa a Ag, Cu y Zn. Asimismo, calcularon la eficiencia de asimilación, la concentración de proteínas similares a las metalotioneínas y la ruta de introducción del metal desde la fase disuelta, en mejillones de tipo *Perna viridis* tras dicha exposición. La preexposición a los metales no influyó en la concentración de las proteínas similares a las metalotioneínas. Por otro lado la asimilación del Cd no se vió modificada por la preexposición a los otros tres metales, pero si se vió afectada su ruta de introducción por la Ag y por el Zn. Para Ag su bioacumulación se ve afectada pues su eficiencia de asimilación aumenta al aumentar la concentración de ésta en los tejidos y su absorción en fase disuelta. Además, su consumo en fase disuelta disminuye al aumentar la concentración de Ag y Cu. En cuanto al Zn, su eficiencia de asimilación tampoco se vió influenciada pero sí su consumo desde la fase disuelta por la preexposición a Ag y Zn. Todos estos resultados son consecuencia de la diferente capacidad de unión y toxicidad que muestran los distintos metales sometidos a estudio **[95]**.

Otras investigaciones se basaron en el estudio de otras moléculas además de las proteínas

similares a las metalotioneínas, como bioindicadoras. Así, *Giguére et al.* investigaron la distribución de los metales entre las proteínas similares a las metalotioneínas (en las branquias), los niveles de glutatión peroxidasa, glutatión reductasa (en la glándula digestiva), y malondialdeído (MDA) (en las branqueas y en la glándula digestiva). La concentración de proteínas similares a las metalotioneínas y de Cd en las branquias aumenta al incrementarse la concentración de Cd, mientras que los niveles de Cu y Zn son independientes de la concentración libre de estos metales. La MDA sufre un incremento en las branquias con el aumento de la concentración de Cd, sin embargo, no hay constancia de cambio en lo que se refiere a la glándula digestiva, mientras que para la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa su actividad en la glándula digestiva se ve incrementada con la presencia de Cu **[81]**.

Como se puede observar, es numerosa la bibliografía que trata tanto de metales ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas del mejillón, como sobre la especiación de las distintas isoformas que estas presentan.

6.1.1- MORFOLOGÍA DEL MEJILLÓN

En Europa se comercializan principalmente dos especies de mejillón, *la Mytilus edulis* y la *Mytilus galloprovincialis*. La primera se extiende desde Portugal hasta el mar del norte, ocupando las costas atlánticas de Francia, Reino Unido, Irlanda y Holanda. Mientras que la segunda ocupa todo el mar Mediterráneo, y en el océano Atlántico, las costas de Marruecos, Portugal y Galicia **[96]**. Diversos estudios realizados sobre su forma, genética y fisiología parecen reforzar la opinión de que no se trata de dos especies propiamente dichas, sino de dos razas o, a lo sumo, dos subespecies en vía de separación evolutiva en especies **[63]**. Aún así, se pueden citar algunas diferencias entre ambas como por ejemplo, en el *M. galloprovincialis* el extremo anterior de la concha suele ser más agudo y encorvado y por otro lado la unión de los músculos aduptores anteriores es más pequeña en esta especie. El *M. edulis* presenta en el manto un color pardo-amarillo frente al negro-violáceo que presenta el *M. galloprovincialis*. Sin embargo, las dos especies tienen el mismo número de cromosomas y se pueden hibridar entre sí, por lo que muchos autores los consideran como dos razas genéticamente diferentes dentro de la misma especie **[96]**. En la siguiente tabla (**tabla 3**) quedan recogidas otras diferencias a tener en cuenta entre ambos tipos de mejillón.

Los mejillones viven en zonas intermareales y submareales, pudiendo llegar hasta profundidades de 9 metros. Son organismos de carácter sedentario y gregario, que se fijan unos sobre otros formando grandes colonias. Generalmente los encontramos recubriendo rocas, formando grupos muy compactos y fuertemente adheridos a superficies y grietas, lo que les proporciona un método de defensa contra las olas y la posibilidad de ocupar zonas de mar abierto **[96]**.

La forma de los mejillones es diferente según el hábitat en el que se encuentren. El estrés al que se ven sometidos los mejillones del litoral o de roca al quedar al descubierto con frecuencia, les impide alimentarse en abundancia ya que tienen que destinar parte del alimento ingerido al desarrollo de una concha más dura y resistente para poder combatir la acción mecánica del mar. Sin embargo, los mejillones de batea y los que viven en rocas sumergidas pueden alimentarse de forma continuada. Además, apenas sufren los efectos del oleaje, lo que hace que tengan una concha más fina y que presenten mayores tamaños **[63]**.

Tabla 3: Diferencias entre *M edulis* y *M. galloprovincialis* **[63, 96]**

		M. galloprovincialis	**M. edulis**
DISTRIBUCIÓN		Mediterráneo-Atlántico. Abundante en las costas de Portugal y España.	Francia, Holanda, Gran Bretaña, Irlanda, Mar del Norte.
MORFOLÓGICAS	Color del borde del manto	Violeta o púrpura oscuro	Claro. Crema amarillento o pardo
	Charnela	Menos alargada	Más alargada
	Músculo aductor anterior	Pequeño	Grande
	Extremo apical	Puntiagudo. Curvado hacia dentro	Romo, redondeado
	Relación alto/largo	Menor	Mayor
	Concha con estrías violáceas longitudinales	Si	No
FISIOLÓGICAS	Reposo sexual	Corto	Más largo
	Liberación de gametos cuando están juntos	En distinta época	En distinta época
	Consumo de O_2	Decrece a partir de 25 grados	Decrece a partir de 20 grados
	Ritmo cardiaco a la misma T^a	Inferior	Superior
	Resistencia a bajas T^{as}	Hasta 7 grados	Hasta 0 grados
	Resistencia a bajas salinidades	Hasta 19 por mil	Hasta 7 por mil

Como el resto de los moluscos bivalvos, el mejillón es un animal que carece de esqueleto interno, siendo por lo tanto invertebrado. El cuerpo no articulado, de simetría bilateral, formado por dos lóbulos simétricos (el manto) que envuelven la masa visceral, de la que sobresale el pié, se encuentra encerrado en una concha. La concha se cierra por la acción de los músculos aductores, anterior y posterior, que unen las valvas. La concha se compone fundamentalmente de cristales de carbonato cálcico incrustados sobre una matriz de tipo proteico denominada conquiolina, y está recubierta en su superficie externa por una fina película de color marrón también proteica, el periostraco **[96]**. Esta superficie externa presenta unas finas estrías concéntricas, que indican las diferentes etapas de crecimiento del animal, mientras que la cara interna es de color violácea y aspecto nacarado, y en ella se puede distinguir los puntos de inserción de los distintos músculos del mejillón. El cuerpo del mejillón se encuentra cubierto por el manto, que está formado por dos lóbulos unidos desde el extremo anterior al posterior a lo largo de la línea dorsal (**figura 3**). En la zona posterior forman un orificio para la salida del agua, el denominado sifón exhalante, quedando libres en la zona ventral las branquias y la salida del pié y del biso permitiendo así la entrada del agua (**figura 3**). Es de color variable dependiendo del sexo, blanquecinas en los machos y anaranjados en las hembras, y su papel fundamental es la formación de la concha y la secreción del filamento aunque también interviene en el proceso reproductivo. Al separar los lóbulos nos encontramos con la cavidad paleal en la que se encuentran alojados los distintos órganos del animal, destacando por su color llamativo rojizo o anaranjado, de estructura musculosa, redondeada y alargada, el pie. Éste tiene el extremo posterior ocupado por una glándula que segrega el biso, el cual está formado por un conjunto de filamentos, de naturaleza proteica que acaban con un pequeño disco adhesivo con los que el mejillón se adhiere a las rocas. En la cara interna del manto se encuentran unas láminas delgadas, muy tenues y delicadas de color pardo que son las branquias (**figura 4**). Éstas dividen la cavidad paleal en dos partes, una más externa situada entre las branquias y el manto denominada cámara inhalante, y otra interior delimitada por la cara interna de las branquias, denominada cámara exhalante. Su función es fundamentalmente respiratoria y alimenticia **[63, 96]**.

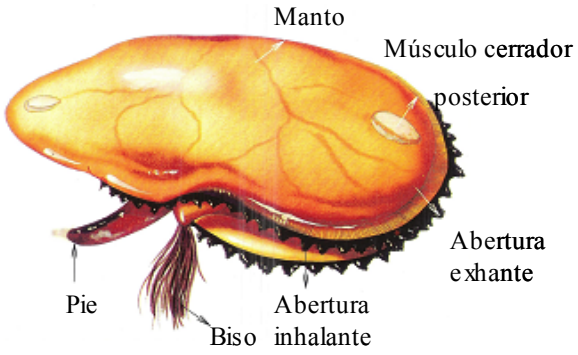


Figura 3: Morfología exterior del mejillón **[63]**

El aparato digestivo está formado por la boca situada en la parte anterior del cuerpo, rodeada de dos pares de palpos labiales (**figura 4**), un esófago y el estómago del que salen dos conductos que se ramifican y forman la glándula digestiva y el intestino que acaba en el ano cerca del sifón exhalante.

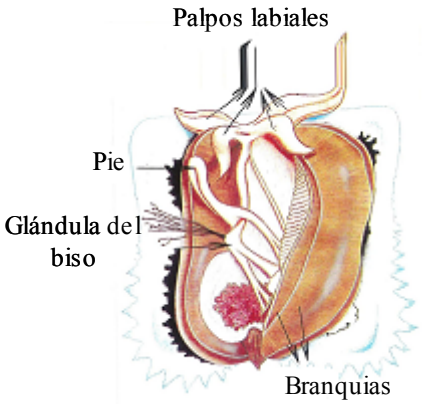


Figura 4: Anatomía interna del mejillón **[63]**

El aparato circulatorio está formado por el corazón, el sistema arterial y el venoso, y su principal función es la de distribuir por todo el cuerpo el alimento y el oxígeno. Del corazón, constituido por un ventrículo y dos aurículas, salen dos arterias que se ramifican y acaban formando las venas que llevan la sangre a las branquias donde se oxigena para posteriormente volver al corazón. El aparato excretor está formado por las glándulas pericárdicas y dos riñones. Las sustancias de deshecho que lleva la sangre son eliminadas por las glándulas pericárdicas, vertiéndose directamente a la cavidad pericárdica. De ahí pasan a los riñones desde donde son expulsados al exterior. El sistema nervioso es de tipo ganglionar y está formado por tres tipos de

ganglios; cerebrales, viscerales y pediales, conectados entre sí, de los que salen numerosos nervios que se extienden por todo el cuerpo del mejillón. Además de los ganglios nerviosos aparecen distintos órganos de los sentidos, entre los que destacan los tentáculos del manto, que permiten detectar las variaciones en la composición del agua, y los estatocitos que son los responsables del equilibrio **[96]**. Poseen sentido del tacto, gusto e incluso de equilibrio. Son capaces de saber si se encuentran acostados o de pie y son sensibles a los cambios de luz, mostrando ojos aunque muy poco desarrollados **[63]**. Por último, el aparato reproductor está formado por las gónadas, que en las féminas tiene un color anaranjado y en los machos de color blanquecino. Las gónadas están formadas por numerosos folículos unidos formando ramificaciones que desembocan en un poro genital, situado cerca del músculo aductor posterior. Los productos sexuales, espermatozoides y ovocitos, se forman en las paredes de los folículos y en el momento de procreación son expulsados a la cavidad palial por el poro genital, y de ahí al exterior mediante el sifón exhalante **[96]**.

Los mejillones se alimentan principalmente a través de mecanismos de filtración, mediante el cual se recogen las partículas alimenticias, materia orgánica y fitoplancton que se encuentran en suspensión en el agua y las incorpora a su organismo. **[96]**. La filtración es un proceso biológico que se va a ver influenciado por diversos aspectos. Así, los mejillones de menor tamaño tienen con relación a su tamaño una mayor tasa de filtración que los grandes. A su vez, la cantidad de agua filtrada depende de la disponibilidad de alimento; si éste es escaso la velocidad de filtración aumenta y, si este es abundante, disminuye. El proceso de filtración también se ve influenciado por la temperatura; a mayor temperatura mayor filtración **[63, 96]**. En el proceso de filtración no se retienen todas las partículas que lleva el agua, por ejemplo, las partículas más pequeñas, menores de 3µm, pueden atravesar los poros de las branquias sin ser retenidas, mientras que las más grandes, o más pesadas, son expulsadas al exterior **[96]**. Se ha calculado que un mejillón es capaz de filtrar entre 0,5 y 7,0 litros de agua a la hora, lo que implica que desde que mide 20 milímetros hasta que alcanza los 8 centímetros pasan por su interior entre 20 y 23 metros cúbicos de agua, lo que extrapolado a una batea son 150000 metros cúbicos diarios de agua.

El alimento que ingieren se basa fundamentalmente en materia orgánica en forma de partículas inertes (detritos) y fitoplancton (microalgas o plancton vegetal). También consumen bacterias aunque en menor medida y son capaces de absorber directamente sustancias orgánicas que se encuentran disueltas en el agua de mar. Se creía que los detritos eran la base alimenticia de estos moluscos, y que consumían una cantidad tres veces superior a la de fitoplancton. Pero se ha visto que esto no es así ya que parte de los detritos que filtran no son capaces de ingerirlos. En general, se alimentan de uno u otro dependiendo de la concentración en la que se encuentren estos

en el agua. El fitoplancton es un conjunto de algas marinas que se encuentran suspendidas en el agua de mar a merced de las corrientes; su abundancia va a depender de los ciclos estacionales ya que esta está relacionada con la disponibilidad de luz y nutrientes **[63]**. En la **figura 5** se puede observar como penetra el alimento en el interior del mejillón.

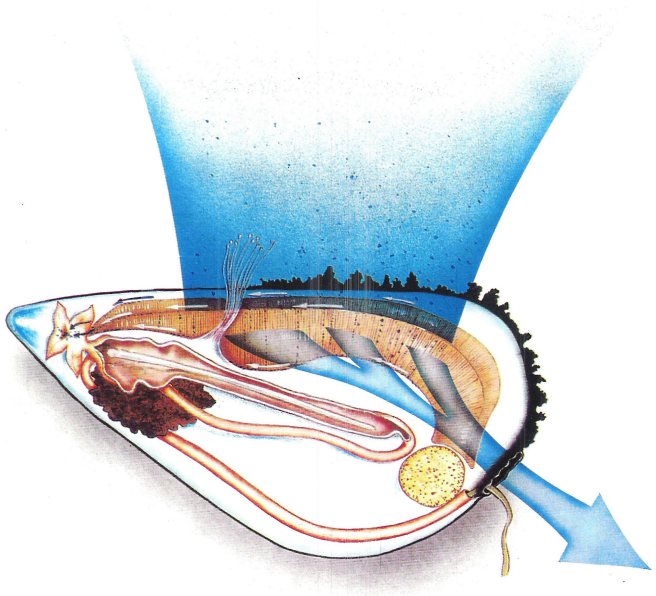


Figura 5: Esquema que refleja la entrada del alimento en los mejillones **[63]**

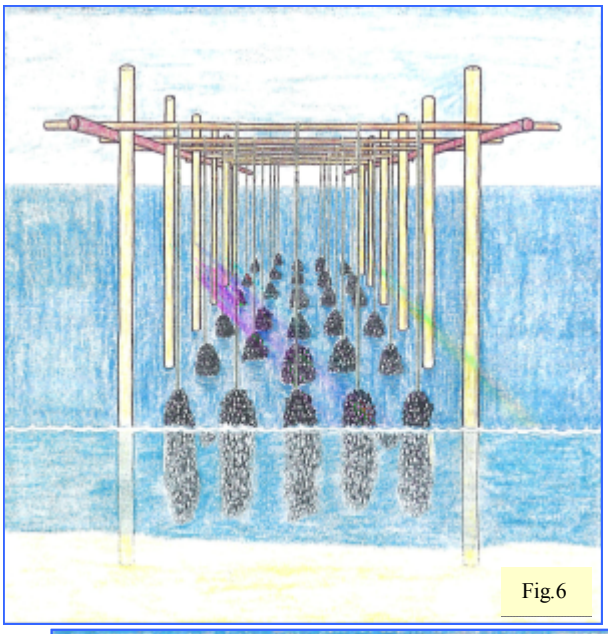
El mayor o menor crecimiento de los mejillones viene determinado por las situaciones de estrés a los que se vea sometido, así como la cantidad y calidad de alimento, del aprovechamiento de éste y de la cantidad de energía que es capaz de obtener y del gasto que de éste hace. Sólo cuando la energía obtenida sea mayor que la gastada el remanente quedará formando parte de las reservas que se utilizarán para procesos como la reproducción o el crecimiento de estructuras orgánicas **[96]**. Otros factores que hay que tener en cuenta en el estudio del crecimiento del mejillón son aquellos relacionados con las condiciones ambientales, como los períodos de desecación, las temperaturas y salinidades cambiantes y la acción mecánica del oleaje. Todos ellos actúan de forma negativa tanto en la actividad filtradora como en el metabolismo del mejillón y la producción de fitoplancton en el mar. Por ello, todos los individuos que se localicen en zonas cambiantes van a presentar un menor crecimiento. Además, se ven mayores incrementos en los meses de verano que en los de invierno debido a la estabilidad que conlleva el cambio estacional **[63, 96]**.

7- CULTIVO DEL MEJILLÓN

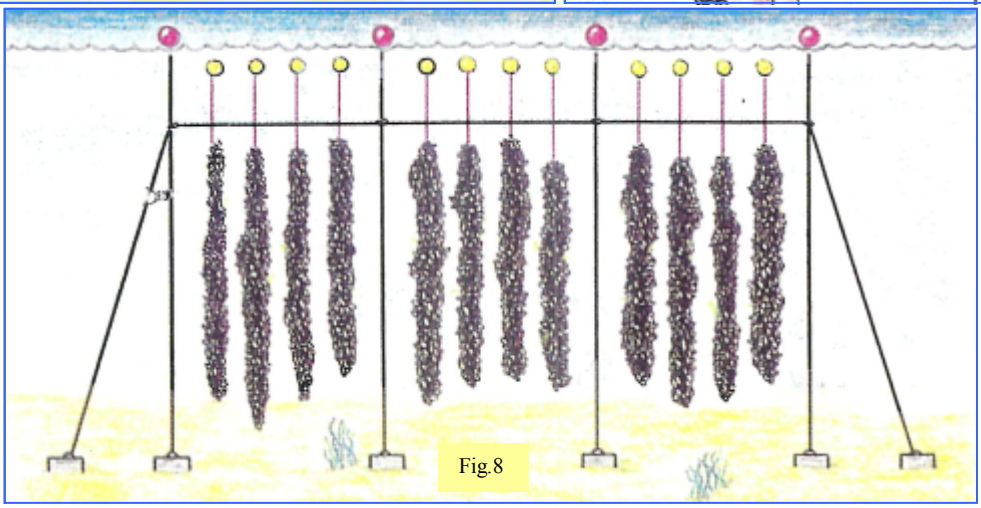
La miticultura es una actividad realizada por más de cuarenta países y que en el año 2000 generó una producción de 1,3 millones de toneladas. El mayor productor de mejillón es China con 500000 toneladas (referido todo al año 2000), seguido de España con más de 250000 toneladas e Italia, Nueva Zelanda, Francia y Holanda que superaron las 60000 toneladas, siendo el continente Europeo donde se produce la mitad de toda la producción mundial. Entre el año 1991 y 2000 se produjo un incremento en la producción mundial de mejillón del 23%. Si nos referimos a España, pasó de representar un 12% de la producción marina en el año 1972 a representar un 23% en la actualidad. En cuanto a la producción gallega, la cosecha de mejillón representa el 60% de los desembarcos de productos frescos de la pesca **[97]**. Las rías gallegas producen en la actualidad el 97% del mejillón cultivado en España, repartiéndose el resto entre Cataluña y la Comunidad Valenciana **[63]**.

Los principales métodos de cultivo de mejillón son tres: en estacas, sobre el fondo y en suspensión (**figuras 6**, **7** y **8**). Este último puede ser tanto en estructuras fijas (emparrillados o en línea) como en flotantes (bateas). Hay que destacar que el sistema en suspensión presenta ventajas sobre el resto ya que se obtienen mejores rendimientos que en el de fondo y el crecimiento es mayor que en el de estacas (el mejillón permanece más tiempo sumergido). La elección de un tipo de cultivo u otro depende de varios factores. Así:

- Si contamos con costas de poca profundidad, con fondos de lodo y con rangos de mareas elevados, el método más adecuado es el de estacas.
- Si la costa tiene poco fondo, con sustrato firme de forma que el mejillón no se hunda y quede poco tiempo sumergido, seleccionaremos el sistema de fondo.
- Para costas con poca profundidad, con rangos de marea mínimos y alta protección, se pueden utilizar los métodos de suspensión como el de emparrillado.
- Para costas con rango mareal elevado y gran profundidad se empleará el método de suspensión en bateas o *long-lines*.
- En zonas muy expuestas o en aquellas con inviernos duros en las que pueda quedar la superficie del mar helada se usará el *long-lines*.**[97]**







Figuras 6, 7, 8: Cultivo en emparrillado, estacas y en línea **[96]**

En Galicia el método utilizado es el de suspensión flotante en bateas. En este método la simiente del mejillón se coloca sobre las cuerdas que cuelgan de unas plataformas flotantes denominadas bateas, donde permanecen hundidos hasta que alcanzan el tamaño comercial **[87]**. Una batea es una estructura flotante anclada al fondo marino mediante un sistema de amarre y que a su vez está formada por una serie de flotadores que soportan un esqueleto (entramado) al que se atan las cuerdas de las que penden los mejillones. El número de flotadores varía de 4 a 6. Estos son de chapa de hierro cubiertos de resina de poliéster y de una capa de fibra de vidrio, que soportan el

entramado de vigas de madera de eucalipto de las que cuelgan las cuerdas de cultivo, que son de nylon. Todo el conjunto está fijado en el punto de fondeo mediante un peso muerto que está unido al entramado mediante una cuerda gruesa. Las dimensiones de las bateas varían de un país a otro. En Galicia las dimensiones máximas son de 500 m^2 útiles a los que hay que sumar los del espacio ocupado por los flotadores, por lo tanto no supera los 550 m^2. En cuanto al número y longitud de las cuerdas de cultivo, el número máximo de cuerdas permitido en Galicia es de 500 y la longitud de las mismas de 12 metros. Dichas cuerdas están divididas en dos zonas; una superior de materia más resistente, y de longitud aproximada de 1,5 metros, donde no se coloca el mejillón; y otra parte inferior, que es donde se realiza el cultivo, que es de nylon. En esta última zona se realizan divisiones cada 45 centímetros mediante palillos de plástico para evitar así el desplome del mejillón y aumentar la duración de las mismas, ya que la zona superior se deteriora antes debido a su exposición al sol y al aire. Hoy en día se cuenta en todo el litoral gallego con unas 3300 bateas **[96, 97]**.

Tras una reglamentación sobre la explotación de viveros de cultivo publicada en 1961 en el B.O.E., una orden de 1974 estructura y cuantifica el número de bateas que podrán fondearse en cada uno de ellos, distribuyéndolos por provincias marítimas y denominándolos por letras según ordenación alfabética. El número máximo de fondeos en cada polígono es el resultado de alinear los viveros en filas y en columnas, teniendo en cuenta que la distancia entre sus centros debía estar entre los 100 y los 200 metros **[63]**. De este modo las bateas están situadas en el interior de las rías, distribuidas en polígonos. El número de polígonos así como la cantidad de bateas en cada uno varía de unas rías a otras de modo que la Ría de Arousa contiene el 68% del total de bateas, la Ría de Vigo el 14,5%, la de Pontevedra el 9,7%, la de Muros-Noia el 3,6% y la de Ares el 3,4% **[96]**.

En la **figura 9** se recoge la situación de los diferentes polígonos en las rías donde la presencia del cultivo de mejillón es más acusada.

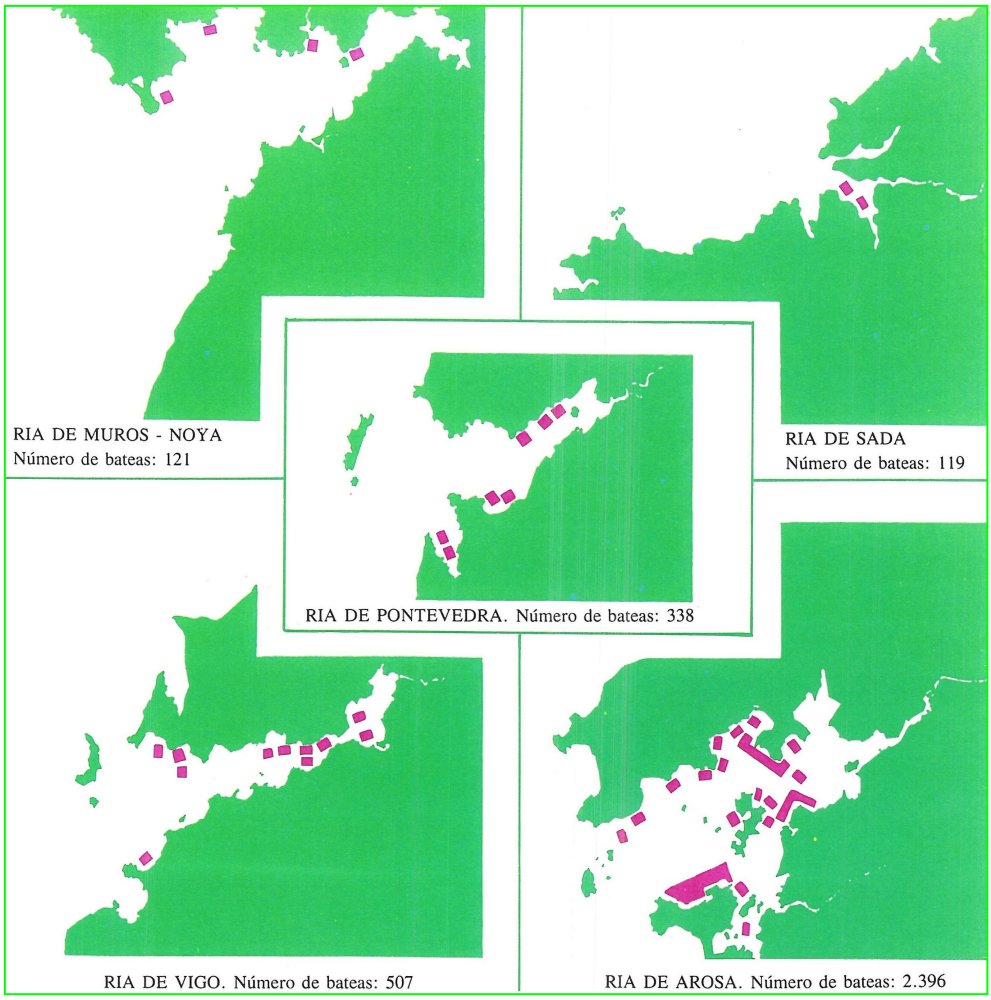


Figura 9: Distribución de los polígonos en las diferentes Rías Gallegas **[63]**

Atendiendo a las fases de cultivo, estas van a ser cuatro: obtención de la simiente, encordado de la simiente, desdoble y cosechado **[63, 96, 97]**. La simiente, cuyo tamaño está entre 1 y 2 cm, se obtiene o bien de las rocas o de cuerdas colectoras utilizadas únicamente para este fin, que se cuelgan de las bateas en los meses de marzo, abril y mayo. Una vez que se tiene la simiente se procede al encordado, que consiste en envolver éstas sobre las cuerdas mediante una red fina biodegradable, generalmente de algodón o acetato, que se descompondrá a los pocos días. En el momento de colocación, las cuerdas tienen un peso que oscila entre los 15 y los 30 Kg. Al cabo de unos 4 ó 6 meses, las cuerdas pueden llegar a multiplicar su peso por 10, por lo que se hace necesario realizar una fase de desdoble ya que debido al exceso de peso en cada cuerda y a la superpoblación, el crecimiento individual de cada mejillón disminuye. Este desdoblamiento se suele realizar entre los meses de junio y octubre, incluso pueden llegar a realizarse dos

desdoblamientos, aunque esta última práctica no es muy aconsejable. El proceso de desdoble consiste en repartir el peso, producción de cada cuerda en otras dos o cuatro, teniendo ahora cada cuerda un peso entre 30 y 80 Kg y el tamaño de mejillón de entre 45 y 55 mm. El último paso de todo el proceso de cultivo es el de cosechado que tiene lugar durante todo el año, presentando su punto álgido entre los meses de octubre y marzo, la época de recogida está relacionada con el contenido en carne del mejillón y con el tipo de comercialización que se va a seguir después. Así, si este va a ser destinado a conserva se recogerá durante el verano, y si es destinado para el consumo fresco se colectará durante el otoño y el invierno **[96]**.

8- ÁREA DE ESTUDIO. RÍA DE AROUSA

8.1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA COSTA GALLEGA

Existen numerosas variables y características de la costa gallega que es necesario tener en cuenta si queremos comparar muestras de diferentes localidades. Esto se debe a la falta de homogeneidad marcada por la dispersión geográfica de los complejos hidrolitorales y por la variabilidad de las condiciones ambientales. Las variables consideradas son el clima, las oceanográficas y las características litológicas. El clima va a controlar el grado de descomposición biológica de los elementos biodegradables y el nivel de aportes de materiales a los estuarios dependientes del volumen de las lluvias. Las variables oceanográficas nos indican el diferente grado de aporte de los nutrientes a lo largo de la costa. Por último, las características litológicas nos determinarán el grado de enriquecimiento en los diversos metales. Esta es la variable más importante a tener en cuenta. Se puede afirmar que la litología gallega es muy variada, así se pueden diferenciar tres zonas a lo largo de toda la franja costera:

1. Zona 1: correspondiente a la Costa Cantábrica; en esta zona son abundantes los esquistos, gneises y rocas sedimentarias y ultrabásicas.
2. Zona 2: comprende Ponte do Porco-Ría de Corme y Laxe; donde predomina el granito y los esquistos.
3. Zona 3: relativa a la Coste Oeste; aquí el dominio es granítico, en la desembocadura del río Tambre hay presencia de esquisto y gneis, presentando litologías muy complejas la cuenca del río Ulla y Redondela (Ría de Vigo).

La costa gallega se caracteriza por presentar numerosa zonas correspondientes a estuarios, donde se desarrollan complejos hidrolitorales de gran importancia ecológica. Se han contabilizado unos 44 espacios naturales de este tipo cuyas principales funciones son:

- Función de purificación de las aguas; realizan esta función debido a la capacidad que poseen para minimizar los efectos de los contaminantes mediante la inmovilización de éstos en los sedimentos.
- Funciones biológicas naturales; como el soporte de la cadena trófica.
- Provisión temporal de hábitats; presentan numerosos hábitats para un gran número de especies tanto acuáticas como terrestres, sedentarias o estacionales.

- Funciones sociales, científicas y económicas. **[59]**

Un estuario se puede definir como una masa de agua semicerrada que está en contacto con el mar, donde el agua dulce procedente de los ríos se mezcla con el agua salada. Se distinguen tres zonas dentro de un estuario:

1. Zona inferior; donde el contacto del agua del mar con el agua salada es dominante.
2. Zona media; zona de mezcla entre el agua dulce y la salada.
3. Zona superior; donde la influencia del agua dulce del río es predominante.

Asimismo, podemos clasificar los estuarios en tres tipos:

I. Estuarios bien mezclados: Estos estuarios presentan fuertes mareas de modo que la salinidad va a ser homogénea y apenas hay variación de ésta con la profundidad.
II. Estuarios parcialmente mezclados: Se caracterizan por presentar mareas moderadas de modo que la mezcla entre el agua dulce y la salada es parcial.
III. Estuarios con cuña salina: Son estuarios formados por ríos que desembocan en mares donde casi no hay mareas, haciendo que el agua dulce menos densa que la salada fluya por encima de esta provocando así una cuña salina. **[98]**

Las peculiaridades oceanográficas de la costa gallega, junto con el gran aporte de nutrientes, hacen de las rías un ecosistema excepcional que se manifiesta de una forma más relevante en las Rías Baixas debido al proceso de afloramiento que en éstas ocurre con mayor intensidad. El proceso de afloramiento está relacionado con la rotación de la tierra, con el giro anticiclónico de las corrientes marinas del Atlántico Norte y con la climatología. Se origina como consecuencia de que los vientos de componente norte soplan paralelos a la costa desplazando las masas de agua superficiales hacia el océano y haciendo que el agua subsuperficial, que es la portadora de los nutrientes que hay en el fondo del océano, ocupe, ayudada por una corriente de origen mediterráneo, el lugar dejado por la primera (*upwelling*), ocurriendo el fenómeno contrario si los vientos son del sur (*downwelling*) **[96, 97]**. Las corrientes que van a intervenir en este proceso son principalmente tres:

1. Corriente de agua mediterránea que se localiza entre 1200 y 700 metros de profundidad; es una corriente de agua de salinidad mayor, proveniente del mar Mediterráneo que ayuda a fluir a la

corriente noratlántica.

2. El agua central noratlántica, situada entre 500 y 70 metros de profundidad; está por encima de la masa de agua proveniente del mediterráneo y en el ascenso hacia la superficie se enriquece de los nutrientes que luego se depositan sobre el fondo tras el contacto con el talud continental. Es por lo tanto fría y rica en nutrientes.

3. El agua superficial, desde 70 metros hasta la superficie; tiene por lo tanto poco espesor lo que favorece su desplazamiento hacia mar abierto. **[63]**

En la **figura 10** se observa la dirección de la corriente mediterránea hacia las costas gallegas, favoreciendo con su presencia el proceso de afloramiento.

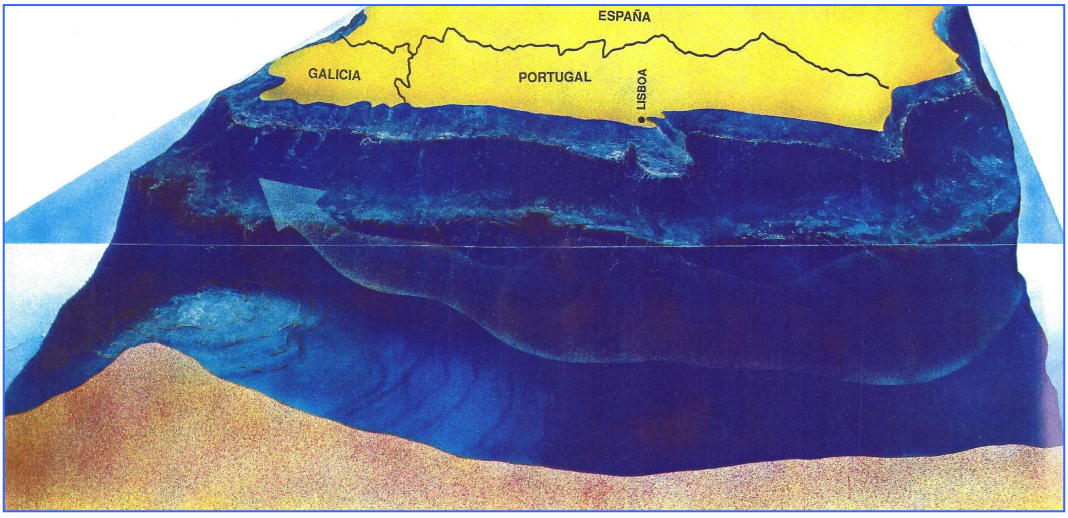


Figura 10: Corriente Mediterránea dirigiéndose a las costas gallegas **[63]**

Entre marzo y octubre van a dominar los vientos del norte debido a la presencia del anticiclón de las Azores que se sitúa en el Atlántico Norte. Cuando éste se desplaza hacia el norte de África dominarán los vientos del sur; esto se produce durante el resto del año. Se pueden producir entonces dos tipos de fenómenos el de *upwelling-downwelling* y el de *downwelling-upwelling*. El primero tiene lugar desde febrero a abril y el segundo sobre todo en octubre. Otra característica a tener en cuenta en las rías es su morfología de V la cual favorece el intercambio de materia con la plataforma continental **[97]**.

Si nos referimos a los aspectos oceanográficos más destacados que presentan las rías

podemos citar:

- **Circulación del agua:** El agua dulce, que proviene normalmente de algún río, flota por encima de la salada. Al mismo tiempo que se mezclan y que se elimina al océano, esta pérdida es compensada por el agua oceánica del fondo.
- **Salinidad:** El valor de ésta varía de una estación a otra generalmente por el efecto de las lluvias y riadas, haciendo que en verano sea mayor que en invierno.
- **Corrientes de marea:** Corrientes originadas en el interior de las rías. Se caracterizan por el transporte de sedimentos y nutrientes que realizan.
- **Temperatura:** Es un factor importante a tener en cuenta ya que va a influir tanto en las características físico-químicas del agua como en la actividad biológica de los organismos. Cabe destacar que en invierno las temperaturas son superiores en las aguas más profundas que en las superficiales ocurriendo lo contrario en verano.
- **Oxígeno:** La cantidad de oxígeno presente va a depender de diferentes hechos como la presencia de oleaje, vientos, corrientes, de la salinidad o de la temperatura. En general la concentración de oxígeno es buena. **[63]**

8.2- LA RÍA DE AROUSA

La Ría de Arousa es la ría que presenta mayor productividad debido al excelente proceso de afloramiento que en ella se produce. En esta ría además de los afloramientos (**figura 11**) que ocurren principalmente en la época estival, acaecen otros, denominados microafloramientos. Tanto unos como otros se ven favorecidos por las condiciones de luz y temperatura que permiten un excelente desarrollo del fitoplancton. Otra característica a destacar presente en la Ría de Arousa es la aparición de un termoclima en verano. El termoclima es una línea, imaginaria, que separa aguas de distinta temperatura, lo cual puede provocar que el proceso de afloramiento se paralice temporalmente **[63]**. En la **figura 11** se observa un esquema idealizado de un proceso de afloramiento.

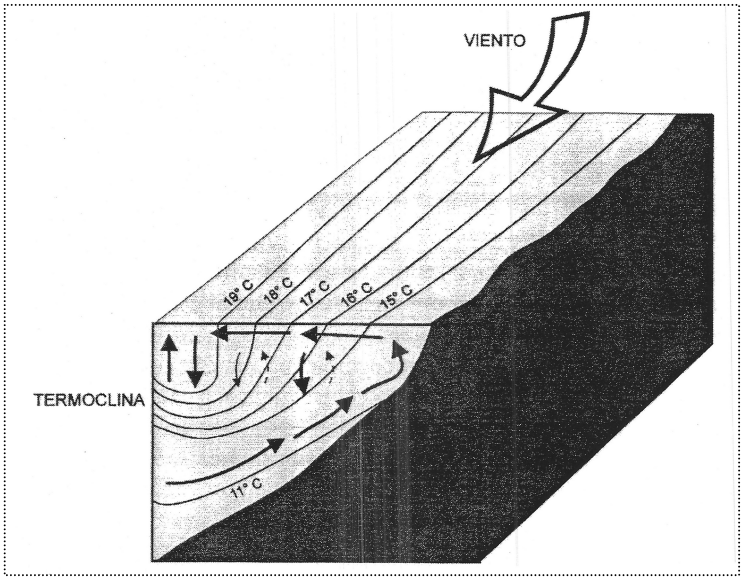


Figura 11: Esquema idealizado de un proceso de afloramiento, como el que puede ocurrir en la Ría de Arousa **[89]**

La Ría de Arousa es la ría que presenta la mayor extensión, con unos 253 Km^2. La distancia máxima en su boca es de 10,3 Km y su longitud no llega a los 30 Km. Esta ría pertenece a dos provincias, la cara norte (o margen derecho si tomamos como origen la desembocadura del Río Ulla) a la provincia de A Coruña limitando con la Ría de Muros-Noia, y la sur (margen izquierdo) a la provincia de Pontevedra, limitando con la ría que lleva el mismo nombre. Destacan en ella principalmente dos tipos de rocas, las graníticas y las de tipo metamórfico.

Atendiendo a su topografía submarina, la Ría de Arousa consta de un canal principal central que presenta profundidades de hasta 60 m. Los movimientos de agua vienen determinados por las mareas, los aportes de agua dulce provenientes tanto de las lluvias como de los ríos (Ulla y Umia), y de los vientos. Las mareas, influenciadas por las condiciones metereológicas, situación geográfica, profundidad y topografía del fondo, van a realizar las funciones de distribución de los sedimentos, renovación del agua y movilización de los nutrientes.

Como ya se comentó, en la Ría de Arousa es donde nos vamos a encontrar con la mayor concentración de bateas (69% del total de bateas que existe en las rías gallegas) **[97]**. En la **figura 12** se recoge una clasificación de los polígonos en la Ría de Arousa, en bueno, medio y malo, según la productividad de cada uno, viéndose que son mejores aquellos que están localizados hacia

la desembocadura de la ría, esto se debe sobre todo a la mayor disponibilidad de alimento **[63]**.

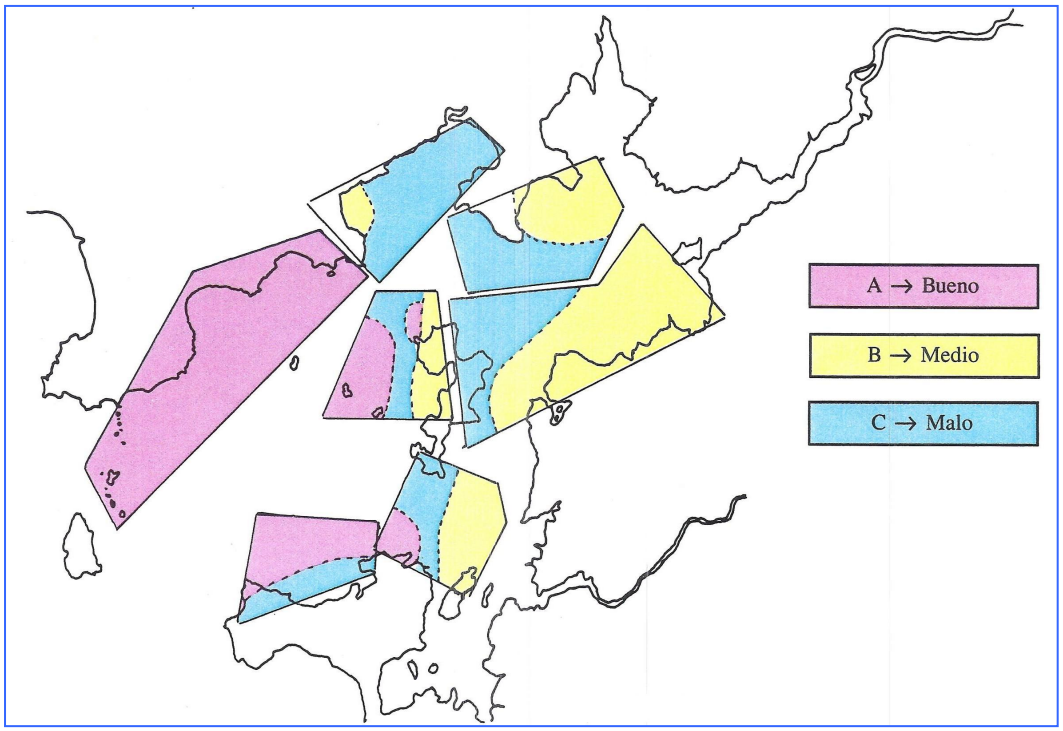


Figura 12: Clasificación de los polígonos de bateas de mejillón de la Ría de Arousa en buenos, medios y malos **[63]**

La Ría de Arousa presenta salinidades muy variables, aunque con precipitaciones abundantes se llegan a alcanzar salinidades prácticamente nulas, lo cual ha causado en determinadas épocas una importante mortandad en los mejillones. Por otro lado, la cantidad de oxígeno es buena y la temperatura en la superficie varía entre los 16º C y los 18º C y en las aguas más profundas entre 13º C y 14º C en la estación estival. En invierno se alcanzan mayores temperaturas en las aguas profundas, 12º C y 14º C, mientras que en las superficiales oscila entre 10º C y 12º C, cumpliéndose el fenómeno de inmersión térmico que ocurre en la mayoría de las rías gallegas. La **figura 13** muestra la circulación del agua en la ría en la Ría de Arousa.

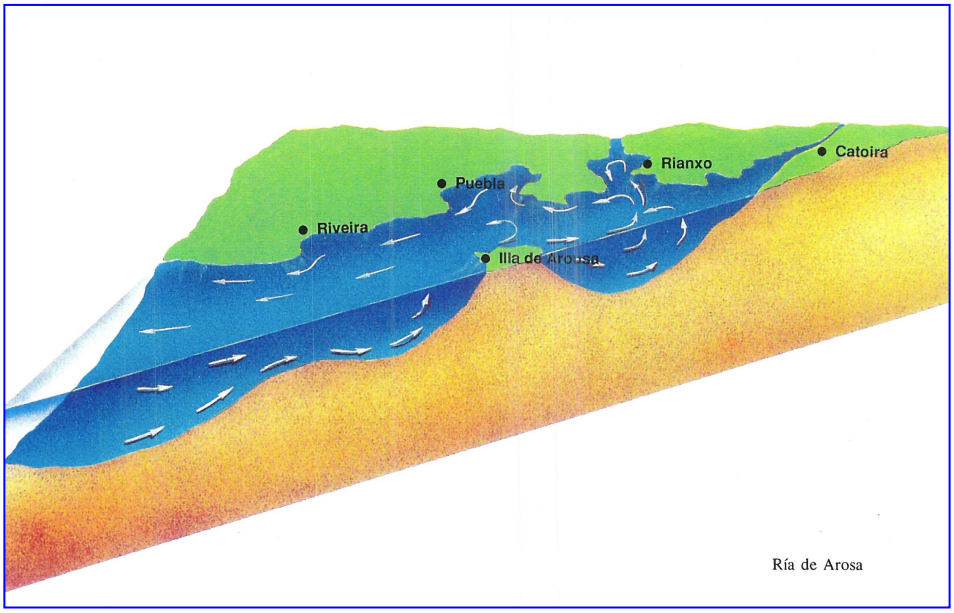


Figura 13: Circulación del agua en el interior de la Ría de Arousa **[63]**

Los problemas de contaminación son más acusados en la Ría de Arousa debido a que es un ecosistema prácticamente cerrado. La contaminación orgánica es uno de los tipos de contaminación que hay que tener más presentes. Ésta es debida principalmente a los vertidos tanto domésticos como industriales que se realizan directamente al mar, así como la materia orgánica que involucra todo el proceso de cultivo del mejillón. El gran aporte de esta materia hace que disminuya la cantidad de fitoplancton, ya que aumenta la turbidez y con ello la disminución de la penetración de la luz. En esta ría se han encontrado puntos en los que sedimentos superan el 16% de concentración de materia orgánica, siendo el máximo recomendado un 6%. Una consecuencia de dicha contaminación es la aparición de las denominadas mareas rojas.

Podemos decir entonces que esta ría presenta una riqueza extraordinaria favorecida por el fenómeno de afloramiento y por la estructura protectiva que presenta. Por ello, es donde la concentración de bateas de mejillón es más elevada que en ninguna de las otras rías **[99]**.

9- LEGISLACIÓN

La legislación existente referida a la concentración de metales presentes en los mejillones queda recogida en la Orden del 2 Agosto de 1991; orden por la que se aprueban las normas microbiológicas, los contenidos en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de pesca y acuicultura (B.O.E. 15.08.1991). Según esta orden, los límites máximos de contenido en metales son los que se citan a continuación:

- Cd: 1ppm
- Cu: 20ppm
- Hg: 1ppm
- Pb: 5ppm
- Sn: 250 ppm

El Real Decreto 345/1993, derogado parcialmente por el Real Decreto 571/1999, establece las normas que deberán aplicarse tanto a las aguas como a la producción de moluscos bivalvos vivos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos vivos, en orden a una mejora y protección de las aguas que permita salvaguardar su vida y crecimiento, así como garantizar su buena calidad para el consumo humano directo o previa transformación. Este Real Decreto incorpora los aspectos relativos a la producción, como los de carácter sanitario, contenidos en la Directiva 91/492/CEE. En cuanto a las normas relativas a la calidad de las aguas, éstas se incorporaron mediante la Directiva 79/923/CEE ya traspuestas por el Real Decreto 38/1989. Así, en cuanto a metales, la calidad exigida a las aguas es la mostrada en la **tabla 4**.

En el Real Decreto 1521/1984 se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de los establecimientos y productos de la pesca y acuicultura con destino a consumo humano (B.O.E. 22.08.84). Dicho Decreto fue modificado por los siguientes decretos, Real Decreto 645/1989 (B.O.E.13.06.89), Real Decreto 1193/2000 (B.O.E. 04.07.00) y Real Decreto 1292/2002 (B.O.E. 03.12.02).

La reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos queda recogida en el Real Decreto 571/1999. Este Real Decreto prevé la necesidad de dar difusión a la relación de zonas de producción, con indicación de su ubicación y sus límites, en las que se podrán recolectar moluscos bivalvos vivos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodernos marinos vivos. De conformidad con esto y con

el Real Decreto 345/1993, se dictó la Orden del 20 de Diciembre del 1993, por la que se hacen públicas las relaciones de producción de moluscos y otros invertebrados marinos en el litoral español.

Tabla 4: Características de las aguas para la cría de moluscos bivalvos

Parámetros aplicables	
Parámetro	Metales: Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (mg/l)
G (Guía)	La concentración máxima en la carne de los moluscos deberá ser tal que contribuya a una buena calidad de los moluscos conforme al artículo 1.
I (Obligatorio)	La concentración de cada sustancia en el agua para la cría de moluscos o en la carne no deberá rebasar un nivel que provoque efectos nocivos en dichos moluscos y en sus larvas. Se deberán tener en cuenta los efectos sinérgicos de estos metales.
Método de análisis de referencia	Espectrometría de absorción atómica precedida, eventualmente por una concentración o una extracción
Frecuencia mínima de muestreo y medición	Semestral

Con relación al comercio de exportación, la legislación existente se basa en la Orden del 15 de Junio de 1971 del Ministerio de Comercio, por la que se dan las normas de calidad para el comercio de exportación de mejillones frescos y la Orden del 21 de Mayo de 1971 del Ministerio de Comercio, relativa a las normas de calidad comercial que regulan el comercio exterior de los moluscos y crustáceos frescos.

Existen a mayores otras disposiciones, tanto comunitarias como nacionales, referidas a criterios microbiológicos, toxinas o enfermedades de los moluscos bivalvos

.

BIBLIOGRAFÍA

10- BIBLIOGRAFÍA

[1] Jack E. Fergusson, *"The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects"*. 1990 Ed. Pergamon Press. Londres, Reino Unido.

[2] H. M. Dix, "*Environmental Pollution*". 1981 Ed. John Willey&Sons. Nueva York, Estados Unidos.

[3] Des W. Connell, *"Basic Concepts of Environmental Chemistry"*. 2005 CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

[4] C. O. Barrenetxea, A. P. Serrano, M. N. G. Delgado, F. J. R. Vidal, J. M. A. Blanco *"Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química"*. 2003 Thomson Editores, Paraninfo S. A. Madrid, España.

[5] J. O. Nriagu, M. S. Simmons, *"Environmental Oxidants"*. 1994 Ed. John Willey&Sons. Nueva York, Estados Unidos.

[6] J. Wase, C. Foster, *"Biosorbents for MetalIons"*. 1997 Ed. Taylor and Francis. Londres, Reino Unido.

[7] T. G. Spiro, W. M. Stigliani *"Chemistry of the Environmental"*. 1996 Ed. Prentice Hall. Nueva Jersey, Estados Unidos.

[8] R. N. Reeve, *"Environmental Analysis"*. 1994 Ed. John Willey&Sons. Chichester, Reino Unido.

[9] R. M. Harrison *"El Medio Ambiente. Introducción a la Química Medioambiental y a la Contaminación"*. 1999 Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

[10] J. E. Figueruelo, M. M. Dávila, *"Química Física del Medio Ambiente"*. 2001 Ed. Reverté. México D.C., México.

[11] G. V. Iyengar, *"Element Analysis of Biological Systems"*. Volumen I, 1989 Ed. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

[12] B. J. Alloway, D. C. Ayres, *"Chemical Principles of Environmental Pollution"*. 2da edición 1997 Ed. Chapman & Hall. Londres, Reino Unido.

[13] C. H. Walker, S. P. Hopkin, D. B. Peakall, *"Principles of Ecotoxicology"*. 1996 Ed. Taylor & Francis. Londres, Reino Unido.

[14] R. A. Meyers, *"Molecular Biology and Biotechnology. A Comprehensive Desk Reference"*. 1995 Ed. VCH Publisers. Nueva York, Estados Unidos.

[15] L. J. Banaszak, *"Foundations of Structural Biology"*. 1996 Ed. Academy Press. San Diego, Estados Unidos.

[16] J. C. Giddings, *"Chemistry, Man and Environmental Change"*. 1973 Ed. Canfield Press. San

Francisco, Estados Unidos.

[17] C. Baird, *"Química Ambiental"*. 2001 Ed Reverté. Barcelona, España.

[18] T. A. Scout, E. I. Mercer, *"Concise Encyclopedia Biochemistry and Molecular Biology"*. 3ra edición 1997 Ed. W de G. Berlín, Alemania.

[19] G. Álvarez Llamas, M. R, Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, *"Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 460-466.

[20] T. Minami, C. Yoshita, M. Tanaka, K. Kubo,, N. Okabe, Y. Okazaki, *"Separation of metallotionein isoforms of mouse liver cytosol by capillary zone electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 347-354.

[21] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Speciation of metal complexes with biomolecules by reversed-phase HPLC wit ion-spray and inductively coupled plasma mass spectrometruc detection"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1998, 361, 267-273.

[22] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Polymorphism and Identification of Metallothionein Isofrms by Reversed-Phase HPLC with On-Line Ion-Spray Mass Spectrometric Detection"*. Analytical Chemistry, 1998, 70, 2536-2543.

[23] C. Ferrarelo, M. R. Fernández de la Campa, H. Goenaga Infante, M .L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Improved separation of rabbit liver metallothioneins by FPLC-ICP-MS: a comparison with the conventional anion-exchange chromatography"*. Analusis, 2000, 28, 351-356.

[24] K. Polec, J. Szpunar, O. Palacios, P. G. Duarte, S. Atrian, R. Łobiński, *"Investigation of metal binding by recombinant and native metallothioneins by capilary zone eletrophoresis (CZE) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) via a self-aspirating total consumption micronebulizer"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2001, 16, 567-574.

[25] K. Polec, O. G. Arribas, M. P. Calvo, J. Szpunar, B. R. Ozonas, R. Łobiński, *"Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1363-1368.

[26] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection"*. Journal of Chromatography A, 1998, 829, 127-136.

[27] J. H. Beattie, *"Strategies for the qualitative and quantitative analysis of matallothionein isoforms by capillary electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 255-270.

[28] H. Goenaga Infante, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Vesicle-mediated hih performance liquid chromatography coupled to hydride generation inductively coupled plasma*

mass spectrometry for cadmium sopeciation in fish cytosols". Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 519-524.

[29] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Detection of artefacts and peak identification in reversed-phase HPLC of metallothioneins by electrospray mass spectrometry"*. Talanta, 1999, 48, 109-118.

[30] M. J. Stillman, C. F. Shaw III, K. T. Suzuki, *"Metallothioneins. Synthesis, Structure, and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal-Thiolate Complexes"*. 1992 VCH Publishers, Inc. Nueva York, Estados Unidos.

[31] P. M. Gehrig, C. You, R. Dallinger, C. Gruber, M. Brouwer, J. H. R. Kägi, P. E. Hunziker, *"Electrospray ionization mass specvtrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: Evidence for metal-binding cooperativity"*. Protein Science, 2000, 9, 395-402.

[32] A. K. Kabziński, *"Quantitaive determination of Cu-thionein from human fluids with application of solid-phase extraction on covalent affinity chromatography with thiol-disulphide interchange support"*. Biomedical Chromatography, 2000, 14, 160-165.

[33] A. K. Kabziński, *"Application of solid-phase extraction to the preconcentration of metallothionein and metals from physiological fluids"*. Journal of Chromatography A, 1997, 766, 121-131.

[34] K. A. High, J. S. Blais, B. A. J. Methven, J. W. McLaren, *"Probing the Characteristics of Metal-binding Proteins Using High-performance Liquid Chromatography-Atomic Absorption Spectroscopy and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry"*. Analyst, 1995 120, 629-634.

[35] C. Ruiz, A. R. Rodríguez, *"Study of the additions of cadmium and zinc to the cadmium, zinc metallothioneins using differential pulse polarography Influence of the pH"*. Analytica Chimica Acta, 1996, 325, 43-51.

[36] O. Nieto, G. Hellemans, G. Bordin, M. De Ley, A. R. Rodríguez, *"Characterisation of human adult kidney Cd, Zn-metallothioneins by differential pulse polarography"*. Biolectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 46, 45-54.

[37] X. Yu, M. Wojciechowski, C. Fenselau, *"Assessment of Metals in Reconstituted Metallothioneins by Electrospray Mass Spectrometry"*. Analytical Chemistry, 1993, 65, 1355-1359.

[38] G. van Yyncht, G. Bordin, A. R. Rodríguez, *"Rabbit Liver Metallothionein Subisoform Characteisation Using Liquid Chromatography Hyphenated to Diode Array Detection and Electrospray Ionisation Mass Spectrometry"*. Chromatographia, 2000, 52, 745-752.

[39] A. Viarengo, B. Burlango, F. Dondero, A. Marro, R. Fabbri, *"Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes"*. Biomarkers, 1999, 4, 455-466.

[40] E. M- B. Colombres, P. L. Zarain, *"Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas"*. Sociedad Mexicana de Bioquímica C. A, 1999, 18, 21-27.

[41] S. Otsuka, T. Yamanaka, *"Metalloproteins. Chemical Properties and Biological Effects"*. 1988 Ed. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

[42] E. J. Baran, *"Química Bioinorgánica"*. 1995 Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España.

[43] G. E. Batley, *"Trace Element Speciation: Analytical Methods"*. 1989 Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.

[44] A. K. M. Kabziński, *"The determination of environmental and industrial exposure to heavy metals based on the quatitative isolation of metallothionein from human fluids, with application of covalent affinity chromatography with tiol-disulphide interchange gel as a solid-phase extraction support"*. Talanta, 1998, 46, 335-346.

[45] Y. Tan, P. Ager, W. D. Marshall, H. M. Chan, *"Approaches to the Deternmination of Metallothionein(s) by High-performance Liquid Chromatography-Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1996, 11, 1183-1187.

[46] R. Lobinski, H. Chassaigne, J. Szpunar, *"Analysis for metallothioneins using couled techniques"*. Talanta, 1998 46, 271-289.

[47] K. A. High, B. A. Methven, J. W. McLaren, K. W. M. Siu, J. Wang, J. F. Klaverkamp, J. S. Blais, *"Physico-chemical characterization of metal binding proteins using HPLC-ICP-MS, HPLC-MA-AAS and electrospray-MS"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1995, 351, 393-402.

[48] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, J. Carrrasco, A. Sanz Medel, *"Speciation of Metallotionein-like Proteins of the Mussel Mytilus edulis at Basal Levels by Chromatographic Separations Coupled to Quadruple and Double-Focusing Magnetic Sector ICPMS"*. Analytical Chemistry, 2000, 72, 5874-5880.

[49] M. J. Bebianno, W. J. Langston, *"Cadmium and metallotionein turnover in different tissues of the gastropod Littorina littorea"*. Talanta, 1998, 46, 301-313.

[50] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, M. Montes Bayón, A. Sanz Medel, *"Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallotionein-like proteins in mussels by Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Time-of-Fligth Mass Spectrometric detection"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1558-1563.

[51] G. Roesijadi, B. A. Fowler, *"Purification of Invertebrate Metallotioneins"*. Methods in Enzimology, 1991, 205, 263-271.

[52] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, C. Sariego Muñiz, A. Sanz Medel, *"Metal distribution patterns in the mussel Mytilus edulis cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection"*. Analyst, 2000, 125, 2223-2229.

[53] Casarett and Doull´s, *"Toxicology. The basic science of poisons"*. 3era edición 1986 Ed. McMillan Publising Company. Nueva York, Estados Unidos.

[54] N. Irving Sax, *"Dangerous Properties of Industrial Materials"*. 1984 Ed. Van Nostrand Reinhold Company. Nueva York, Estados Unidos.

[55] M. Repetto, *"Toxicología Fundamental"*. 3era edición 1997 Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.

[56] C. D. Klaassen, J. B. Wathing, *"Manual de Toxicología"*. 5ª edición 1999 Ed. McGraw-Hill. México D. C., México.

[57] M. Repetto, *"Toxicología Avanzada"*. 1995 Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.

[58] J. E. Figueruelo, M. M. Dávila, *"Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales"*. 2004 Ed. Reverté. Barcelona, España.

[59] A. Carballeira, E. Carral, X. M. Puente, R. Villares, *"Estado de Conservación de la Costa de Galicia. Nutrientes y Metales Pesados en Sedimentos y Organismos Intermareales"*. 1997 Ed. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

[60] F. W. Fifield, P. J. Haimes, *"Environmental Analytical Chemistry"*. 2da edición 2000 Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford, Reino Unido.

[61] J. M. Hellawell, *"Biologycal Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Managent"*. 1986 Ed. Elsevier Science Publishers Ltd. Londres, Reino Unido.

[62] Wen-Xiong Wang, *"Comparison of metal uptake rate and absorption efficiency in marine bivalves"*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20, 1367-1373.

[63] C. D. Neira, R. A. Castroviejo, J. S. Caamaño, *"El Mejillón. Biología, Cultivo y Comercialización"*. 1990 Ed. Galicia Editorial. Santiago de Compostela, España.

[64] M. Etxeberria, M. P. Cajaraville, I. Marigómez, *"Changes in Digestive Cell Lysososmal Structure in Mussels as Biomarkers of Environmental Stress in the Urdaibai Estuary (Biscay Coast, Iberian Peninsula)"*. Marine Pollution Bulletin, 1995, 30, 599-603.

[65] C. Locatelli, *"Proposal of new analytical procedures for heavy metal determinations in mussels, clams and fishes"*. Food Additives and Contaminants, 2000, 17, 769-774.

[66] J. E. Tahán, J. M. Sánchez, V. A. Granadillo, H. S. Cubillán, R. A. Romero, *"Concentration of Total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb, and Zn in Comercial Canned Seafood Determined by Atomic*

Spectrometric Means after Mineralization by Microwave Heating". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43, 910-915.

[67] D. A. Lord, J. W. McLaren, R. C. Wheeler, *"Determination of Trace Metals in Fresh Mussels by Atomic Absorption Spectrometry with Direct Solid Sample Injection"*. Analytical Chemistry, 1977, 49, 257-261.

[68] M. M. Storelli, A. Storelli, G. O. Marcotrigiano, *"Heavy metals in mussels (Mytilus galloprovincialis) from the Ionian Sea, Italy"*. Journal of Food Protection, 2000, 63, 273-276.

[69] B. S. Miller, *"Mussels as biomonitors of point and diffuse sources of trace metals in the Clyde Sea Area, Scotland"*. Water of Science Technology, 1999, 39, 233-240.

[70] H. E. Azouzi, M. L. Cervera, M. de la Guardia, *"Multi-elemental analysis of mussel samples by atomic absorption spectrometry after room temperature sonication"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1998, 13, 533-538.

[71] C. G. Bruhn, J. Y. Neira, M. I. Guzmán, M. M. Darder, J. A. Nóbrega, "*Study of chemical modifidiers for the determination of chromium in biological materials by Tungsten Coil Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1999, 364, 273-278.

[72] L. G. Favretto, G. P. Marletta, M. Saitta, *"Principal component analysis: a chemometric aid for classification of polluted and unpolluted mussels"*. Analytica Chimica Acta, 1989, 220, 135-144.

[73] N. S. Fisher, J. L. Teyssié, S. W. Fowler, Wen-Xiong Wang, *"Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions"*. Environmental Science Technology, 1996, 30, 3232-3242.

[74] V. Besada, J. Fumiga, A. Vaamonde, *"Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (Mytilus galloprovincialis) from the Spanish North-Atlantic coast 1991-1999"*. The Science of the Total Environment, 2002, 288, 239-253.

[75] Z. K. Gaspic, I. Ujevic, A. Baric, *"The Mediterranean blue mussel as an environmental indicator of metal pollution in coastal area of eastern Adriatic"*. Fresenius Environmental Bulletin, 2002, 11, 620-625.

[76] R. Beiras, J. Bellas, N. Fernández, J. I. Lorenzo, A. Cobelo-García, *"Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (Mytilus galloprovincialis) versus embryo-larval bioassays using Paracentrotus lividus and Ciona intestinalis"*. Marine Environmental Research, 2003, 56, 531-553.

[77] A. Oros, I. Pecheanu, R. Mihnea, "*Same aspects concerning trace metals bioaccumulation in Mytilus galloprovincialis along the Romanian Black Sea coastal area".* Journal of Environmental Protection Ecology, 2003, 4, 850-856.

[78] P. Licata, D. Trombetta, M. Cristani, D. Martino, F. Nacari, *"Organochlorine compounds and heavy metals in the soft tissue of the mussel Mytilus galloprovincialis collected from Lake Faro (Sicily, Italy)"*. Environmental International, 2004, 30, 805-810.

[79] G. P. Domouhtsidou, S. Dailianis, M. Kaloyianni, V. K. Dimitriadis, "*Same aspects concerning trace metalks bioaccumulation in Mytilus galloprovincialis along the Romanian Black Sea coastal area"*. Marine Pollution Bulletin, 2004, 48, 572-586.

[80] M. Romero, Y. Mourgaud, A. Geffard, M. Gnassia-Bareli, J. C. Amiard, H. Budzinski, *"Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions"*. Environmental Toxicology, 2003, 18, 295-305.

[81] A. Giguere, Y. Couillard, P. G. C. Campbell, O. Perceval, L. Hare, B. Pinel-Aloul, J-. Pullerin, *"Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetalllic gradient"*. Aquatic Toxicology, 2003, 64, 185-200.

[82] M. Radlowska, J. Pempkowiak, *"Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel Mytilus edulis"*. Environmental International, 2002, 27, 605-608.

[83] Z. Dragun, M. Erk, B. Raspor, D. Ivankovic, J. Pavicic. *"Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels Mytilus galloprovincialis Lmk"*. Environmental International, 2004, 30, 1019-1025.

[84] Y. Mourgaud, E. Martínez, A. Geffard, B. Andral, J.-I. Stanisiere, J.-C. Amiard, *"Metallothionein concentration in the mussel Mytilus galloprovincialis as a biomarker of response to metal contamination: Validation in the field"*. Biomarkers, 2002, 7, 479-490.

[85] C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco, A. Sanz-Medel, *"Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel Mytilus edulis by ortogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration"*. Spectrochimica Acta Part B, 2002, 57, 439-449.

[86] C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco, A. Sanz-Medel, *"Multielement trace-element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP-MS"*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2002, 373, 412-421.

[87] K. A. High, V. J. Barthet, J. W. McLaren, J.S. Blais, "*Characterization of metallotionein-like proteins from Zebra mussels (Dreissena Polymorpha)"*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997, 16, 1111-1118.

[88] B. Raspor, Z. Dragun, M. Erk, D. Ivankovic, J. Pavicic, *"Is the digestive gland of Mytilus galloprovincialis a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins?"*. The Science of the Total Environment, 2004, 333, 99-108.

[89] P. Irato, G. Santovito, A,. Cassini, E. Piccinni, V. Albergoni, *"Metal Accumulation and Binding Protein Induction in Mytilus galloprovincialis, Scapharca inaequivalvis, and Tapes philippinarum from the Lagoon of Venice"*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 44, 476-484.

[90] Y. Hardivillier, V. Leignel, F. Denis, G. Uguen, R. Cosson, M. Laulier, *"Do organism living around hydrothermal vent sites contain specific metallothioneins? The case of the genus Bathymodiolus (Bivalvia, Mytilidae)"*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2004, 19, 111.-118.

[91] V. Leignel, Y. Hardivillier, M. Laulier, *"Small Metallothionein MT-10 Genes in Coastal and Hidrothermal Mussels"*. Marine Biotechnology, 2005, 7, 236-244.

[92] L. Soazig, L. Marc, *"Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (Mytilus edulis) as a biomarker of cadmium contamination"*. Marine Pollution Bulletin, 2003, 46, 1450-1455.

[93] M. A. Serafim, R. M. Company, M. J. Bebianno, W. J. Langston, *"Effect of temperature and size on metallothion synthesis in the gill of Mytilus galloprovincialis exposed to cadmium"*. Marine Environmental Research, 2002, 54, 361-365.

[94] A. Geffard, C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard, *"Do seasonal changes affect metallothion induction by metals in mussels, Mytilus edulis?"*. Ecoxicology and Environmental Safety, 2005, 61, 209-220.

[95] D. Shi, W. X. Wang, *"Modification of trace metal acumulation in the green mussel Perna viridis by exposure to Ag, Cu, and Zn"*. Environmental Pollution, 2004, 132, 265-277.

[96] A. P. Camacho, *"Cultivo do Mexillón na Batea"*. 1991 Ed. Alva. A Coruña,España.

[97] U. Labarta, M. J. F. Reiriz, *"Bateeiros, Mar, Mejillón. Una Perspectiva Bioeconómica"*. 2005 Ed. Galaxia S. A. A Coruña, España.

[98] J. L. Bueno, H. Sastre, A. G. Lavin, *"Contaminación e Ingeniería Ambiental. Contaminación de las aguas"*. 1997 Ed. FICYT. Oviedo, España.

[99] M. F. Piñeiro, *"Historia y Vida de la Ría de Arousa"*. 3^{era} edición 1996 Ed. Aroprint, S. L. A Coruña, España.

CAPÍTULO I

OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ESPECTROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE MEJILLÓN

INDICE

I- INTRODUCCIÓN 61
1.1- Determinación de metales en muestras de mejillón de la Ría de Arousa 63
1.1.1- Tratamiento de la muestra 64
1.2- Métodos de determinación de metales 69
1.2.1- Espectrometría atómica 69
1.2.1.1- Espectrometría de absorción atómica 70
1.2.1.1.1- Espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) 70
1.2.1.1.2- Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) 73
1.2.1.2- Espectrometría de emisión 76
1.2.1.2.1- Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) 77
1.3- Uso del sistema atrapa átomos para la determinación de Cd 81
1.3.1- Introducción al empleo de tubos atrapa átomos 81
II- OBJETIVO 89
III- PARTE EXPERIMENTAL 93
3.1-Reactivos 95
3.2- Material 97
3.3- Limpieza del material 99
3.4- Optimización del procedimiento de determinación de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn en mejillones mediante ETAAS y FAAS 101
3.4.1- Optimización de las condiciones de medida en ETAAS y FAAS 101
3.4.1.1- Pretratamiento de la muestra 101
3.4.1.2- Condiciones óptimas en FAAS y ETAAS para la determinación de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn 102
3.4.2- Estudio de las características analíticas en la determinación de Cr, Cd y Pb por ETAAS y Cu y Zn por FAAS 103
3.4.2.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 103
3.4.2.2- Sensiblidad 104

3.4.2.3- Cálculo del límite de detección (LOD, *Limit of Detection*) 105
3.4.2.4- Cálculo del límite de cuantificación (LOQ, *Limit of Quantification*) 105
3.4.2.5- Precisión del método 106
3.4.2.6 Exactitud del método: análisis de materiales de referencia 107
3.5- Determinación de Cd presente en mejillones mediante STAT-FAAS 108
3.5.1- Pretratamiento de la muestra 108
3.5.2- Tratamiento de los tubos de cuarzo 108
3.5.3- Estudios preliminares 108
3.5.4- Estudio de las características analíticas en la determinación de Cd en mejillones mediante STAT-FAAS 109
3.5.4.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 111
3.5.4.2- Estudio de la sensibilidad, LOD y LOQ 113
3.5.4.3- Estudio de la precisión 114
3.5.4.4- Estudio de la exactitud 114
3.5.4.5- Aplicaciones 115
3.6- Determinación multielemental en muestras de mejillón por ICP-OES 117
3.6.1- Estudio de las características analíticas en la determinación multielemental en muestras de mejillón por ICP-OES 118
3.6.1.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 118
3.6.1.2- Evaluación de los LODs y LOQs del método 119
3.6.1.3- Exactitud del método 120
IV- CONCLUSIONES 123
V- BIBLIOGRAFÍA 127

INTRODUCCIÓN

1.1- DETERMINACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE MEJILLÓN DE LA RÍA DE AROUSA

Existen en nuestra costa 18 rías que se extienden a lo largo de todo el litoral comprendiendo un total del 25% de toda la costa de la península Ibérica. Debido a la importancia socioeconómica que conlleva el cultivo del mejillón en ellas, ha suscitado un gran interés la determinación de la concentración metálica en los diferentes estatus, agua, sedimentos y biota. Podemos citar así la revisión realizada por *Cobelo-García et al.* **[1]** en la que se recogen todos los estudios publicados hasta el año 2000 sobre la concentración de distintos metales presentes en las diferentes rías. Los principales elementos determinados son Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, y Zn, y en menor extensión Hg, Sn, Ag, Se y As. En esta revisión se plasman los niveles de fondo para establecer si las aguas y los sedimentos están contaminadas o no, así como los métodos de extracción y determinación, y los rangos de concentración metálica encontrados en los sedimentos, en las aguas de los ríos que desembocan en las rías, en la materia particulada suspendida y en el agua oceánica de las propias rías. Asimismo, recopila los trabajos que tratan sobre la determinación de la concentración metálica en la biota de las rías tomando como organismos bioindicadores los mejillones de roca y las macroalgas; exponiendo los niveles de fondo, las técnicas de extracción y determinación y las concentraciones encontradas para cada metal, generalmente expresadas en peso seco. En la **tabla 1.1** se pueden ver los valores de fondo y los rangos de concentración para los mejillones de tipo *Mytilus galloprovincialis* (de roca de la Ría de Arousa).

Tabla 1.1: Valores fondo e intervalos de concentración de metal (μg/g) para los mejillones *Mytilus galloprovincialis* en la Ría de Arousa

Nº Estaciones	**Metodología**	**[Cd]**	**[Cr]**	**[Cu]**	**[Zn]**	**[Pb]**
8	AAS/HNO_3	0,3 - 1,6	4,1 - 9,5	32,7 - 138	195 - 717	1,9 - 11,9
Concentraciones de Fondo			5,9	30,2	320,5	11,1

Para el Zn, Cd y Pb existe correlación entre la concentración de metal presente en el tejido del mejillón y la concentración metálica encontrada en los sedimentos. Esto no ocurre, por el contrario, con el Cr y el Cu.

Beiras et al. **[2]** valoraron el estado de contaminación de la costa gallega tras el análisis de sedimentos, aguas y mejillones tipo *Mytilus galloprovincialis* de tres rías; Ría de Arousa, ría de Pontevedra y ría de Vigo. Tras el tratamiento de los datos se vió que la ría más contaminada es la de Pontevedra, siendo ésta menos importante en las rías de Arousa y Vigo.

Otros estudios, como por ejemplo el de *Saavedra et al*. **[3]**, se basan en la optimización de un método de digestión en microondas que permite la determinación de una serie de elementos en el digerido de muestras de mejillón de la Ría de Arousa por ETAAS y FAAS. Tras la optimización mediante diseño de experimentos del proceso de digestión, se obtiene un método preciso, exacto y más rápido que el que el de calentamiento convencional.

1.1.1- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Podemos clasificar las muestras según el estado en el que se encuentren, esto es, estado disuelto o líquido o estado sólido. Las muestras sólidas pueden presentar un alto contenido de materia orgánica o ser sólidos totalmente inorgánicos como los metales o rocas **[4]**.

Podemos definir el término preparación de muestra como el procedimiento mediante el cual el tamaño y forma de la muestra es transformado para poder aplicar correctamente el método de ensayo elegido. Este paso del proceso analítico es uno de los más laboriosos, que más tiempo consume y de los que más error conlleva **[5]**. El procedimiento de preparación de la muestra debe ser capaz descomponer y disolver todos los compuestos a los que está asociado el analito, de modo que los elementos estén en disolución para el análisis posterior **[4]**.

En el tratamiento de la muestra se tienen que cumplir los siguientes puntos:

- La preparación de la muestra se debe realizar sin que se produzca pérdida de ningún analito. La pérdida de analito se puede producir a través de procesos de adsorción, absorción, evaporación o descomposición.
- La preparación de la muestra debe incluir la transformación de ésta en la forma química más recomendable para su posterior determinación. Los procedimientos que generalmente se suelen usar para optimizar la forma química o física de los analitos son procesos de calentamiento mediante láseres o choques con moléculas o átomos de alta energía, procesos

de disolución con disolventes o disolución asistida con microondas. Otros procesos son los que engloban a los métodos de digestión, utilizados cuando la muestra no es muy soluble. Éstos se pueden realizar en bombas, mediante la aplicación de microondas (digestión asistida con microondas) o mediante fusión. Por último, existen procedimientos de vaporización, en aquellos casos donde se requiere la introducción de la muestra en estado vapor. Esto último se consigue mediante cámaras de vacío o por calentamiento.

- En este proceso se deben eliminar las interferencias existentes de la matriz. La eliminación de las interferencias se consigue mediante extracciones sólido-líquido, extracciones soxhlet, extracción de fluidos supercríticos, extracción acelerada con disolventes, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida o procesos de diálisis. Otros procedimientos son los de flotación y los de atrapamiento y purga.
- Se debe evitar introducir interferencias procedentes de reactivos o medios de reacción.
- El pretratamiento de la muestra debe incluir, si es necesario, la dilución o concentración de los analitos para ofrecer concentraciones que caigan dentro del rango de trabajo del método de análisis escogido. **[5]**

En nuestro caso nos interesa el análisis de muestras sólidas. Como en la mayoría de las técnicas analíticas se requiere que las muestras estén en estado líquido, los analitos presentes en éstas deberán ser liberados de la matriz antes de su determinación. Los principales métodos de tratamiento de muestra sólida son:

a) Método de calcinación o vía seca, se utiliza para eliminar la materia orgánica de las muestras. Es un método sencillo que permite el tratamiento simultáneo de muchas muestras, además el riesgo de contaminación es mínimo. No es muy adecuado para la determinación de elementos volátiles.

b) Digestión húmeda, es el método más empleado para disolver muestras sólidas y comprende el uso de ácidos minerales. El proceso se lleva a cabo en recipientes de Teflón, material que no ofrece contaminación. Los ácidos más utilizados son el HCl para disolver sales inorgánicas y algunos óxidos, o agua regia, que disuelve metales y gases nobles. El HNO_3 oxida la materia orgánica y el HF se usa para la descomposición de los silicatos. Se puede citar también el $HClO_4$, éste es un ácido muy oxidante que se debe utilizar junto con los ácidos HNO_3 y H_2SO_4 para la descomposición de materia orgánica.

c) Digestiones en recipientes cerrados, el parámetro más importante que determina la velocidad de las reacciones químicas va a ser la temperatura. Para obtener una buena digestión de la muestra son deseables altas temperaturas y para alcanzarlas en muchos casos es necesaria la adición de agentes oxidantes adicionales como el H_2O_2. Este tipo de digestión es como la digestión húmeda sólo que se lleva a cabo en recipientes cerrados a altas presiones. La presión dentro del recipiente se incrementa debido al aumento de la presión de vapor de los reactivos al elevarse la temperatura y de los productos gaseosos de reacción formados. Los ácidos que se suelen usar son el HNO_3 o mezclas de HNO_3 con HSO_4. Las principales ventajas que presenta frente a la digestión húmeda en recipientes abiertos son:

- Es un procedimiento rápido
- Se evitan las pérdidas de compuestos volátiles
- Es posible la descomposición de muestras complejas

Sin embargo, estas técnicas ofrecen el inconveniente de que el calentamiento por convección es muy lento. Por ello en los últimos tiempos se está empleando el calentamiento con microondas, denominándose a esta técnica digestión asistida por microondas **[4]**. El calentamiento es el resultado de la variación del campo eléctrico de microondas. El campo eléctrico aumenta y disminuye con la frecuencia de microondas, causando la rotación de las moléculas de agua (rotación dipolar), el desplazamiento de los iones en las disoluciones iónicas (migración iónica) y el movimiento de los electrones en los materiales metálicos. Los movimientos de rotación de las moléculas de agua disminuyen por la colisión de éstas con las moléculas que las rodean, provocando el calentamiento del líquido. En el caso de los iones éstos son frenados por el líquido y su energía es transferida a través de la disolución en forma de calor. En los metales, el calentamiento se produce por la resistencia al flujo electrónico **[5]**. El proceso consiste en introducir las muestras, junto con una mezcla ácida conveniente, en unos recipientes diseñados especialmente para este tipo de digestión. Esta mezcla se somete a altas frecuencias de microondas. Las moléculas polares como el agua y los ácidos minerales absorben la energía de microondas lo que provoca un rápido calentamiento.

La digestión asistida por microondas es una técnica que no ofrece contaminación y en la cual los tiempos de digestión son muy cortos. Los recipientes están dotados de una válvula de escape para evitar explosiones, generalmente se fabrican de Teflón ya que es un material puro, químicamente resistente y relativamente transparente a la radiación de microondas.

Las variables que afectan a la eficiencia de la digestión con microondas son el tipo de horno microondas, el tipo de recipiente, el número de recipientes, el tipo y la masa de la muestra, los reactivos y la cantidad de éstos, entre otros **[4]**. Las limitaciones que presenta están relacionadas con las temperaturas y presiones límites de los recipientes y con las características físicas y químicas de las muestras **[5]**.

Si se compara con el calentamiento clásico por convección, el calentamiento con microondas es mucho más eficiente. Para disoluciones acuosas la frecuencia de microondas más adecuada es la de 2450 MHz. Esta frecuencia es la empleada por los microondas domésticos, siendo la radiación de microondas proporcionada por el magnetrón, el cual debe estar protegido contra los vapores ácidos. Cabe destacar que la energía dentro del horno no va a ser uniforme y para conseguir que lo sea, las muestras pesadas en los recipientes de Teflón se colocan en el interior de un carrusel, de forma que la distribución de la energía sea lo más uniforme posible **[6]**.

Las principales ventajas que ofrece este método de pretratamiento de la muestra son el corto tiempo necesario para producir la descomposición total de la muestra, el calentamiento directo de muestras y reactivos (los recipientes sólo se calientan de forma indirecta por el calor de la disolución), además se logra un calentamiento homogéneo de la mezcla ácida, la contaminación es mínima y apenas hay pérdida de elementos volátiles **[7]**.

d) Fusión. Este procedimiento se utiliza para la descomposición de muestras geológicas y metalúrgicas. Una cantidad conocida de muestra se mezcla con un fundente en un crisol y se calienta en una llama o en un horno. A continuación el fundido se disuelve en medio acuoso, ácido o básico. Es una técnica de fácil manejo muy empleada para la descomposición de muestras complicadas, pero presenta problemas de contaminación por parte del fundente empleado. Además, la disolución resultante muestra un alto contenido en sales y los elementos fácilmente volatilizables se pueden perder durante el proceso.

e) Suspensiones, las técnicas de espectrometría atómica son capaces de atomizar partículas sólidas suspendidas en disolución. La suspensión es introducida en el atomizador de forma parecida a un líquido. El procedimiento consiste en mezclar la muestra pulverizada con un disolvente, añadiendo un estabilizante, como por ejemplo el Triton X-100, para evitar el depósito de las partículas. A continuación, se agita la mezcla y se procede a realizar la medida. Es adecuado el uso de las suspensiones cuando la disolución de la muestra es difícil o consume mucho tiempo. Es una

técnica sencilla aunque puede presentar problemas de contaminación en el paso de pulverización **[4]**.

f) Digestión asistida por ultrasonidos, se define ultrasonidos como las vibraciones de sonido que ocurren por encima del rango de audición. Las vibraciones mueven, agitan la disolución mediante la generación de burbujas microscópicas que se expanden y contraen. Estas burbujas pueden crecer hasta un tamaño crítico en el cual se produce la colisión y un estado transitorio de altas temperaturas y presiones. Además, una agitación de la disolución provoca que las burbujas rompan la superficie sólida produciendo así la disolución de la muestra **[5]**.

En nuestro caso para la determinación del contenido total de metal en las muestras de mejillón se llevó a cabo un pretratamiento de la muestra basado en digestiones ácidas asistidas por microondas. Se aplica este método porque es una metodología contrastada que garantiza una destrucción total de la materia orgánica.

La muestra se trata con una mezcla de ácidos inorgánicos que puedan descomponer y disolver la matriz, pudiendo tener lugar el cambio químico del analito. La función de los ácidos es la de oxidar la materia orgánica hasta CO_2 y H_2O, de modo que se puedan determinar los componentes minerales. Además, se requiere el empleo de un agente fuertemente oxidante, un ácido mineral concentrado y el aporte de calor para acelerar el proceso de descomposición que va a ser proporcionado por la radiación de microondas. La eficacia del proceso depende de la naturaleza de la matriz y de los ácidos utilizados **[8]**.

1.2- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE METALES

Para la determinación de metales y metales ligados a las MTs, se utilizan diferentes técnicas espectrométricas tales como la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), espectrometría de absorción con atomización electrotérmica (ETAAS), y espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES).

1.2.1- ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

En la Espectrometría Atómica las muestras, generalmente en disolución, son vaporizadas a unas temperaturas entre 2000-6000 K, midiéndose la capacidad que dichos átomos tienen para absorber radiación de una determinada longitud de onda (absorción) o bien la capacidad de emisión de radiación de dichos átomos (emisión o fluorescencia). Estas técnicas presentan una alta sensibilidad y una gran capacidad para determinar un analito en presencia de otros en muestras complejas y además, muchas de ellas pueden realizar análisis simultáneos y multielementales. Todo esto hace que la espectrometría atómica sea una herramienta importante en Química Analítica **[9]**.

Se define la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS, *Atomic Absorption Spectrometry*) como un método analítico que determina elementos presentes en pequeñas cantidades y que se basa fundamentalmente en la absorción de radiación por parte de átomos libres.

En cuanto a la Espectrometría de Emisión Atómica (AES, *Atomic Emission Spectrometry*), al igual que la técnica anterior, se utiliza para medir concentraciones bajas de analitos presentes en diferentes matrices, y se basa en la medida de la emisión producida por átomos libres o iones cuando la excitación es producida mediante la aplicación de energía térmica o eléctrica.

Si la emisión de radiación se produce como consecuencia de la excitación de átomos por absorción de radiación, la técnica espectrométrica es la Espectrometría de Fluorescencia Atómica **[10]**.

1.2.1.1- ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrometría de absorción atómica es una técnica que se usa tanto para la determinación de metales traza como mayoritarios con la única variación del atomizador. Se aplica básicamente a través de tres tipos de atomización: atomización en llama, atomización electrotérmica y atomización vía formación de hidruros covalentes del metal.

La espectrometría de absorción atómica se basa en la absorción de radiación por parte de átomos o iones elementales. Las regiones del espectro que proporcionan más información atómica son la ultravioleta/visible y la de rayos X. Nosotros trabajaremos en la región ultravioleta/visible que es la zona en la que van a absorber los átomos o iones gaseosos de la muestra a analizar, dando lugar a lo que se denominan espectros atómicos que sirven para la determinación, tanto cualitativa como cuantitativa, de los elementos de interés. El espectro de absorción atómico característico consta predominantemente de líneas de resonancia, que son el resultado de transiciones del estado fundamental a niveles energéticos superiores **[11]**.

En espectrometría atómica lo ideal es que los átomos estén libres de la influencia de la matriz, lo cual implica que no estén enlazados a otros átomos, de modo que todas las partículas, moléculas y compuestos deben estar disociados. Esto se consigue atomizando correctamente la muestra a analizar. Los métodos de atomización principales son los hornos y las llamas. Los primeros utilizan para atomizar muestras sólidas, suspensiones y disoluciones. Para ello es necesario mantener el horno en atmósfera inerte, por ejemplo con argon, durante el período de calentamiento para así minimizar las posibles reacciones no deseadas entre los analitos atomizados. Si el horno es calentado eléctricamente el proceso se llama atomización electrotérmica. Otro método de atomización es el que se basa en el uso de llamas, formadas por una combinación de gases, oxidante y combustible, para atomizar muestras en estado líquido y en disolución **[5]**.

1.2.1.1.1- ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA (FAAS)

En esta técnica la muestra es pulverizada dentro de la llama en forma de un aerosol generado por un nebulizador. Esto hace que sea posible la introducción de muestras sólidas y suspensiones directamente dentro de la llama. Existen dos tipos de llamas, las de combustión y las

de difusión. En las mezclas combustible-oxidante la temperatura de la llama varía entre 2000-3000 K. Los oxidantes más usados son el aire y el dióxido de nitrógeno, y en el caso de los combustibles el acetileno, el propano y el hidrógeno. En las llamas de difusión el combustible es a menudo el gas inerte el que arde al ponerse en contacto con el aire de difusión **[10]**. Por otro lado el quemador puede ser de premezcla (también llamado de flujo laminar) o de flujo turbulento (denominado también de inyección o consumición total). Cuando se usan los primeros, la llama es más estable, presenta buenas sensibilidades y reproducibilidad aunque la velocidad de introducción de la muestra es lenta. Los segundos quemadores se caracterizan por ser más seguros, y por permitir la introducción de una gran cantidad de muestra en la llama, aunque presentan problemas relacionados con el atascamiento del sistema por residuos y de dispersión de la radiación por partículas **[10, 12]**.

En el proceso de atomización el combustible, el oxidante y la muestra aspirada se mezclan a través del nebulizador, que generalmente es de tipo neumático, y se obtiene una fina niebla. Dicha niebla es llevada a una cámara de burbujeo donde se rompen las gotas en pequeñas partículas que quedarán en suspensión en el gas, denominadas aerosol, y su formación nebulización. El aerosol, el oxidante y el combustible pasan a través de un deflector que además de producir la mezcla sirve para eliminar las gotas de mayor tamaño. El exceso de líquido se recoge en la cámara de spray y se elimina. El aerosol que llega a la llama contiene aproximadamente un 5% de la muestra inicial **[9]**.

En la llama podemos distinguir tres zonas, la *zona de combustión primaria*, es la zona donde se evapora el disolvente; la *región interconal*, donde se forman los átomos gaseosos y los iones elementales a partir de las partículas sólidas; y la *zona de combustión secundaria*, donde se producen los procesos de oxidación **[13]**. Una vez atomizada la muestra, los átomos absorben la radiación emitida por una lámpara, normalmente de cátodo hueco, aunque también puede ser de descarga de electrodos, que emite en la radiación característica del elemento a determinar. Todo esto previo paso de esta radiación por un sistema de monocromación en el que se selecciona una estrecha banda de longitudes de onda. Por último, se detecta la señal mediante un detector que puede ser un fotomultiplicador, un detector de array de diodos o un detector de transferencia de carga **[9]**. Finalmente, mediante la relación absorbancia/concentración recogida en la ley de *Lambert-Beer* se calcula la concentración del analito de estudio.

La llama más utiliza es la llama de aire/acetileno debido a que ofrece unas características y temperaturas adecuadas para la determinación cuantitativa de un número importante de elementos, como los alcalinotérreos (llama reductora), Ca, Mg, Sr, Cr, Fe, Co, Ni, Mo y metales nobles. Asimismo, el nebulizador más extendido es el neumático pudiéndonos encontrar con otros tipos como el ultrasónico que es muy eficiente **[10]**.

Las principales interferencias con las que nos vamos a encontrar van a ser las químicas, producidas por la existencia de componentes de la muestra que provocan una disminución de la atomización del analito. También existen interferencias físicas, debidas a las características que presenta la disolución de muestra, como temperatura, viscosidad y tensión superficial que pueden influir en los procesos de nebulización y transporte de la muestra. Pueden producirse interferencias de ionización, cuando el analito se ioniza fácilmente, e interferencias espectrales, debidas al solapamiento de la señal del analito con la señal de otras especies que absorben en la misma región del espectro **[9, 10]**. Las interferencias de tipo químico se disminuyen si se usan los llamados *agentes protectores* que forman con el analito especies estables volátiles, y las de ionización añadiendo los *supresores de ionización* que son sustancias que se ionizan más fácilmente que el analito a determinar **[13]**.

La técnica FAAS presenta límites de detección bajos para elementos volátiles, los cuales no forman óxidos ni carburos estables y tienen altas energías de excitación, como el Cd y el Zn. Otros como el Na o el Li presentan límites de detección más altos que en espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Specrometry*) **[14]**.

La FAAS es una de las técnicas más utilizadas gracias a su sencillez, efectividad y bajo costo. Aún así, presenta una serie de inconvenientes relacionados en su mayoría con la anchura de las líneas de absorción, producido por en ensanchamiento *Doppler* y el ensanchamiento por presión **[13]**. Otro problema que presenta es la baja eficiencia en la introducción de la muestra. Esto influye en la sensibilidad y es debido a que una gran porción de la muestra se pierde por el drenaje. Además, otro factor que influye en la sensibilidad es el tiempo de residencia de los átomos en el camino óptico en la llama, que es muy breve **[15]**.

1.2.1.1.2- ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA (ETAAS)

La atomización de tipo electrotérmica proporciona mayor sensibilidad que la llama debido a que toda la muestra se atomiza en un periodo muy breve y el tiempo promedio de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más **[11]**. Durante el proceso de atomización la velocidad de formación de átomos libres es igual o mayor que la velocidad de eliminación de éstos del camino óptico. El mecanismo de formación de los átomos libres depende de numerosos factores como los compuestos que estén presentes en el tubo de grafito a la temperatura de atomización, la atmósfera dentro del horno, la velocidad de calentamiento del horno o la temperatura de operación del mismo **[5]**. Entre las ventajas que presenta frente al uso de las llamas cabe destacar el incremento de la sensibilidad, la utilización de pequeñas cantidades de muestra, la capacidad de analizar muestras sólidas directamente sin tratamiento, el mínimo ruido y el mayor tiempo de residencia de los átomos en el camino óptico **[9, 16]**.

El sistema de atomización en ETAAS es de tipo discreto, es decir, el volumen medido de una disolución es introducido en el dispositivo. Por el contrario, en la llama la disolución de la muestra es aspirada continuamente hasta el quemador para ser atomizada (sistema de atomización continuo).

Existen diversos modelos de atomizadores electrotérmicos de los cuales el más utilizado es el atomizador de horno de grafito. Este consiste en un cilindro de grafito abierto en los dos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra. En el interior del cilindro se encuentra una plataforma, plataforma de *L´Vov*, también de grafito, situada justo debajo del orificio de entrada. En esta plataforma es donde se evapora y calcina la muestra **[11, 17]**. El uso de esta plataforma hace que cuando se produce el calentamiento rápido en el paso de atomización, el aumento de temperatura en la plataforma sea más lento, y cuando el tubo y la fase gas alcanzan la temperatura de atomización y permanecen en equilibrio, la plataforma se caliente rápidamente. Esto provoca que la muestra depositada en la plataforma sea atomizada en un ambiente en el cual la temperatura no cambia y en el que apenas se encuentran interferencias de tipo químico **[10, 16]**. Otros modelos de atomizadores son los denominados de copa de grafito, barra de grafito y el filamento de tántalo. El material con el que se fabrique el tubo debe ser químicamente inerte, debe poseer buena conductividad eléctrica y térmica, además de ser de alta pureza y poseer un coeficiente de expansión bajo y baja porosidad. El grafito presenta todas esas

cualidades, además de otros materiales como el tántalo y el tungsteno. El grafito normal es poroso por naturaleza y esta porosidad se ve aumentada con la aplicación de altas temperaturas. Además, el vapor atómico tiende a difundirse por el tubo de grafito provocando efecto memoria. Otro inconveniente que ofrece el grafito normal es que muchos elementos forman carburos estables a altas temperaturas quedando retenidos en el grafito y disminuyendo así su atomización **[10]**. Se ha demostrado que en muchas ocasiones si se reduce la porosidad del tubo de grafito se diminuyen de forma notable efectos de tipo matriz y problemas de reproducibilidad. Para ello lo que se hace es recubrir el tubo con una delgada capa de grafito pirolítico que permite sellar los poros **[11, 17]**. El grafito pirolítico es más resistente a la oxidación y al ataque químico que el grafito normal y presenta una baja permeabilidad a los gases, lo cual hace que se reduzcan las pérdidas de vapor atómico y se aumente así la sensibilidad **[10]**. Los más utilizados hoy en día son los tubos de grafito pirolítico con plataforma de *L´Vov*.

En atomización electrotérmica las etapas principales a tener en cuenta son:

- Etapa de Secado, en esta etapa se produce la eliminación del disolvente mediante un calentamiento en rampa.
- Etapa de Mineralización, se destruye la matriz de la muestra sin afectar al analito que se quiere determinar. Se consigue aumentando la temperatura hasta un valor en el que el analito permanezca no atomizado.
- Etapa de Atomización, se convierte el analito a determinar en átomos y se evapora, por lo que es importante utilizar una temperatura adecuada para producir la atomización completa.
- Etapa de Limpieza, se realiza para evitar efectos de memoria, de modo que no se produzcan interferencias en análisis posteriores. Consiste en el aumento de la temperatura hasta un máximo durante un período de tiempo pequeño **[18]**
- Etapa de disminución de la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente usando agua como refrigerante y un flujo de gas inerte **[10]**.

Las temperaturas deben optimizarse para cada paso teniendo en cuenta el tipo de analito y la composición de la matriz. El proceso de evaporación del disolvente debe realizarse en unas condiciones tales que no se produzca pérdida del analito por salpicaduras **[16]**.

En el proceso de atomización se pueden tener en cuenta tanto aspectos de índole

termodinámica como cinéticos. Los procesos de tipo termodinámico se refieren a reacciones de evaporación del óxido metálico antes de la atomización, disociación térmica del óxido metálico, reducción del óxido metálico y formación de carburos. En cuanto a los aspectos cinéticos, éstos proporcionan información acerca del mecanismo de atomización, de manera que se pueden establecer las condiciones de atomización y los métodos de registro de la señal, obteniéndose la relación:

$$Señal = K * C \quad \textbf{(Ec. 1.1)}$$

donde K es una constante y C es la concentración.

Una vez que se atomiza la muestra, los átomos e iones formados van a absorber la radiación emitida por una fuente de radiación, generalmente lámparas de cátodo hueco, y la radiación absorbida y la señal se detectan y registran.

Uno de los mayores problemas con los que nos podemos encontrar en la atomización electrotérmica es la presencia de interferencias espectrales, físicas y químicas **[11, 17]**. Cambios en la introducción de la muestra o efectos de memoria, pueden contribuir a las interferencias de tipo físico. Los efectos producidos por la viscosidad de la muestra afectan a la precisión en la deposición de ésta en la plataforma. Esto puede solventarse midiendo en área de pico. Los efectos de memoria debidos a la incompleta atomización o a la limpieza inefectiva del tubo después de ésta se pueden minimizar utilizando temperaturas de atomización y limpieza elevadas **[10]**. Las interferencias de tipo espectral se pueden eliminar mediante el uso de un monocromador o modulando la longitud de onda de absorción. Las interferencias de tipo físico se eliminan utilizando la lámpara de deuterio o el sistema *Zeeman* como sistemas de corrección de fondo, o simplemente mediante el uso del método de adición estándar. **[11, 17]**. Las interferencias químicas son causadas por la reacción del analito con componentes de la matriz, con componentes del tubo de grafito o con el gas inerte **[10]**. El primer tipo de interferencias es debido a que la matriz de la muestra se puede volatilizar con el analito, por lo tanto esto supone un impedimento en la obtención de buenos resultados. Para solventar este problema se utilizan los denominados *modificadores de matriz*, que no son más que sales tanto orgánicas como inorgánicas que se adicionan a la muestra y que provocan un cambio químico en ésta. El objetivo es aumentar la volatilidad de la muestra y disminuir la volatilidad del analito por formación de sales, óxidos y otros compuestos de alto punto de fusión **[9, 10]**. También existen los denominados modificadores

permanentes, que consisten en recubrir el tubo de grafito con una sustancia que actúe de modificador y someterlo a varios ciclos de atomización. Así se evitan problemas de contaminación al ser muy eficientes en el atrapamiento de átomos indeseables. En general los modificadores más utilizados son las sales de paladio y magnesio, $Pd(NO_3)_2$ y $Mg(NO_3)_2$, denominado comúnmente modificador universal **[10]**.

Con esta técnica se alcanzan mejores límites de detección y sensibilidades, debido a que, como ya se indicó, en los hornos de grafito la concentración atómica es mayor, y además se evita la dilución del analito con el disolvente **[14]**. La utilización de FAAS es adecuada cuando la concentración del analito es lo suficientemente grande como para ser medida y si el volumen de disolución adecuado está disponible, mientras ETAAS es adecuado cuando las concentraciones son bajas y el tamaño de muestra limitado **[19]**.

1.2.1.2- ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN

La espectrometría de emisión atómica (AES) es considerada como un método estándar para el análisis de metales. Las restricciones a la hora del tipo de muestra son pocas, ciñéndose a determinadas aleaciones o a cenizas provenientes de compuestos orgánicos presentes en el polvo atmosférico **[16]**. Es una técnica muy utilizada para determinar constituyentes inorgánicos en todo tipo de muestras pero sobre todo en muestras en estado sólido **[19]**. En la espectrometría de emisión atómica una cantidad representativa y reproducible de muestra se sitúa en el camino de la radiación. Los propios átomos o iones libres constituyen la fuente de radiación. Las técnicas de emisión atómica son multielementales ya que todos los elementos presentes en la celda de atomización emiten su espectro al mismo tiempo. Por ello, se puede aplicar cuando se quiere determinar muchos elementos en las mismas condiciones de trabajo **[10]**

La energía requerida para producir el proceso de vaporización y excitación es proporcionada por arcos eléctricos o de chispa, láseres o plasmas compuestos por gases inertes. El espectro atómico emitido por la muestra se usa para determinar la composición elemental de ésta. La longitud de onda a la cual se mide la intensidad de radiación sirve para identificar al analito, mientras que la intensidad de la radiación emitida sirve para hacer la correspondiente cuantificación.

En cuanto a la instrumentación, los componentes principales son tres, a) el sistema de muestreo y atomización, b) el monocromador y c) el detector y sistema de lectura. **[16]**

1.2.1.2.1- ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO POR INDUCCIÓN (ICP-OES)

En la Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma, la muestra se introduce en el plasma donde es evaporada y disociada en átomos e iones libres, que van a ser excitados por el suministro de una energía adicional. Podemos definir un plasma como un gas ionizado neutro y buen conductor de la electricidad, que actúa de fuente de atomización y excitación. Las fuentes de plasma se basan en descargas eléctricas de gas a presión atmosférica. Se parecen a las llamas pero con éstos se alcanzan temperaturas mayores, normalmente superiores a 5000 K. Las altas temperaturas del plasma y la disociación de los compuestos en átomos e iones con su correspondiente excitación son producidas por colisiones con otras partículas, principalmente con electrones libres. El estado excitado alcanzado es inestable y la pérdida de energía se va a producir o bien por colisiones con otras partículas o por transiciones a niveles energéticos inferiores. El resultado de la radiación se denomina espectro espontáneo de emisión.

La instrumentación básica consiste en dos componentes, un generador de la señal que está formado por el sistema de introducción de la muestra (automuestreador, bomba, nebulizador y capilar para la introducción de la muestra) y por la fuente de plasma. El segundo componente es el procesador de la señal, el cual incluye los sistemas electrónicos, ópticos y los referidos a la adquisición de la señal. La fuente de excitación en AES debe poseer las siguientes características, alta especificidad, selectividad, sensibilidad, precisión y exactitud, capacidad para realizar análisis multielementales, fácil manejo y estar libre de interferencias de tipo matriz.

Los plasmas se van a clasificar en tres tipos:

1. Plasmas Acoplados por Inducción (ICP, *Inductively Coupled Plasma*)
2. Plasmas de Corriente Directa (DCP, *Diret Current Plasma*), aquí nos podemos encontrar con varios tipos, plasmas de corriente portadora y plasmas de corriente libre.
3. Plasmas de Microondas, que pueden ser Plasmas Inducidos por Microondas (MIP, *Microwave Inductively Plasma*) o Plasmas Acoplados Capacitivamente con Microondas, (CMP, *Capacity*

Microwave Plasma).

La fuente más común de plasma es el Plasma Acoplado por Inducción que se genera en una antorcha consistente en tres tubos concéntricos fabricados en cuarzo, los cuales reciben el nombre de tubo externo, intermedio y tubo portador de gas. Alrededor de la antorcha hay una espiral de inducción que aplica energía de radiofrecuencias. Dicha espiral está refrigerada ya que se pueden alcanzar temperaturas de hasta 10000 K. Cuando los gases se introducen dentro de la antorcha la corriente de radiofrecuencias se pone en funcionamiento. Se desarrolla un campo magnético oscilante alrededor de la espiral cuyas líneas de fuerza son elipses cerradas. El campo magnético induce un campo eléctrico en la región de la espiral. Cuando los electrones e iones se introducen mediante una descarga tipo Tesla, estos comienzan a oscilar en el interior del campo generando el plasma, siempre y cuando la fuerza del campo magnético sea la suficiente **[10]**.

El agua es el disolvente más adecuado para introducir las muestras aunque se pueden usar mezclas de bajo porcentaje orgánico (disolvente orgánico-agua), aunque no es muy común debido a que éstos reducen las características del plasma llegando incluso a extinguirlo **[5]**.

Los principales tipos de Plasmas Acoplados por Inducción son los ICPs de nitrógeno refrigerado y los ICPs de argon. Los de nitrógeno refrigerado poseen una antorcha de tamaño importante, donde el nitrógeno actúa de gas refrigerante y el argon como gas intermedio y portador. Los de argon tienen antorchas estrechas y poseen dos flujos de argon, en el caso de que el análisis se realice en disoluciones que únicamente estén compuestas por sustancias inorgánicas. Si se analizan muestras que contienen sustancias orgánicas es necesario un tercer flujo de argon.

Normalmente las muestras son introducidas en el plasma en forma de disolución aunque la introducción directa de sólidos y gases es posible. La formación de hidruros y vapor frío son también utilizados en espectrometría de emisión. La muestra en estado líquido, se introduce en el sistema mediante una bomba peristáltica y convertida en aerosol mediante un sistema de nebulización que puede ser de tipo neumático o ultrasónico. Dentro de los nebulizadores de tipo neumático están los nebulizadores concéntricos y los de flujo cruzado. El nebulizador más utilizado es este último. En este proceso de nebulización, el agua y los disolventes orgánicos junto con las gotas generadas de mayor tamaño, son eliminados del aerosol por mecanismos de desolvatación y con el uso de las denominadas cámaras de spray (cámara de *Scott* o cámara ciclónica).

En cuanto al espectrómetro existen numerosos tipos como el espectrómetro con montura de *Paschem-Runge*, *Ebert* y *Czerny-Turner* o *Seya-Namioka*. También existen los que están formados por monocromadores dobles. Según la configuración de la antorcha podemos tener dos tipos, radial y axial. Con la configuración radial la óptica del sistema queda protegida del sobrecalentamiento y de la deposición de sales. Con los axiales se obtienen buenos límites de detección, aunque los resultados dependen mucho del elemento a determinar y de la línea utilizada **[10]**. Por último, los detectores utilizados en emisión son los transductores fotoeléctricos y los espectrómetros de masa (ICP-MS) **[16]**. Recientemente, en los nuevos diseños de espectrofotómetros se han incorporado los dispositivos de transferencia de carga como sistemas de detección. Con ello, se ha conseguido tanto incrementar la resolución espectral como la sensibilidad de determinadas líneas.

Las principales interferencias que ocurren en las técnicas de emisión son:

- Interferencias de nebulización, aparecen cuando la cantidad de muestra varía considerablemente a lo largo del tiempo debido, por ejemplo, a cambios en la viscosidad de la muestra. Las interferencias causadas por la desolvatación son debidas a diferencias entre la volatilidad de la matriz y el analito, lo cual provoca un cambio de la concentración del analito en el aerosol. También pueden aparecer si los sistemas de nebulización y solvatación están constituidos por tubos largos y recipientes de superficies grandes.
- Interferencias químicas: se deben sobre todo a las altas temperaturas, largos tiempos de residencia y a la atmósfera inerte del plasma. Consisten fundamentalmente en la formación de compuestos o radicales estables termodinámicamente. Se pueden mitigar con el uso de plasmas de alta energía y bajas velocidades del gas portador.
- Interferencias de ionización: son producidas por elementos que se ionizan fácilmente, como los alcalinos y los alcalinotérreos. En los ICPs convencionales no son muy acusadas debido a la alta densidad electrónica de la fuente.
- Interferencias espectrales: son generadas por el espectro del argon o por el espectro continuo o de línea de las especies atómicas o moleculares que se introducen en el plasma. **[10]**

En los plasmas de argon se alcanzan temperaturas mucho más elevadas que en caso de las llamas. Estas altas temperaturas junto a la estabilidad y al uso de argon, el cual es químicamente

inerte, hace que se eliminen muchas de las interferencias que presenta la combustión en llamas **[9]**. Las propiedades físicas y químicas de esta técnica hacen que ofrezca unas prestaciones y ventajas de operación superiores a los métodos tradicionales de descarga eléctrica, y que presenten mejores exactitudes, sensibilidades y precisiones que éstos. Hay que tener en cuenta, además, que el rango lineal de concentración para las fuentes de plasma es varios órdenes de magnitud mayor al de otras técnicas de emisión **[16]** y que su uso es adecuado para la determinación de elementos tanto refractarios como el B, U o el P, como los que se excitan con dificultad como el Zn o el Cd **[19]**.

Si comparamos los límites de detección de las técnicas espectrometría de absorción atómica con llama, espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica y espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción, los límites de detección en los métodos que emplean el horno como método de atomización son aproximadamente dos órdenes por debajo de los que utilizan la llama. Esto se debe a que una pequeña cantidad de muestra es confinada en un pequeño volumen durante un intervalo de tiempo bastante elevado si se compara con el de la llama. Por otro lado el plasma acoplado por inducción presenta límites intermedios entre el horno y la llama, aunque se puede llegar a alcanzar sensibilidades parecidas a las del horno cuando se utilizan nebulizadores de tipo ultrasónico **[9]**.

1.3- USO DEL SISTEMA ATRAPA ÁTOMOS PARA LA DETERMINACIÓN DE Cd

1.3.1- INTRODUCCIÓN AL EMPLEO DE TUBOS ATRAPA ÁTOMOS

Un factor importante a tener en cuenta en la utilización de Espectrometría de Absorción Atómica de Llama es la sensibilidad, la cual está limitada por varios factores. Los átomos de analito generados en la llama pasan rápida y continuamente a través de la zona de medida (tiempo de residencia sobre 10^{-3}s) mientras la muestra es aspirada, lo cual influye en la sensibilidad de forma negativa. Otra limitación adicional es la baja eficiencia del sistema nebulizador/quemador, ya que sólo entre un 5 y un 10 % de la disolución de muestra aspirada alcanza la llama. Sin embargo, se están realizando continuos esfuerzos para mejorar la eficiencia en la introducción de la disolución muestra en el sistema. La sensibilidad se puede mejorar si se obliga al vapor atómico a permanecer más tiempo en el camino óptico, mejorando los procesos de nebulización. Se han desarrollado un número importante de técnicas para mejorar la sensibilidad y eliminar las interferencias, basadas en el aumento del tiempo de permanencia de los átomos en estados excitados en el camino óptico. Estas técnicas se clasifican como técnicas atrapa átomos entre las que se encuentran: Delve`s cup (Copa Delves), Tubo Atrapa Átomos y Tubo de Absorción de Larga Trayectoria (LPAT, *Long Path Atom Trap*). El término atrapamiento de átomos es utilizado cuando se usa un sistema de preconcentración directamente sobre la llama, como los nombrados con anterioridad.

La característica más destacada del uso de la técnica de Tubo de Absorción de Larga Trayectoria (LPAT) es que limita la absorción media dentro de una estructura cilíndrica a lo largo de los ejes longitudinales a través de la cual pasa la luz absorbida. El camino óptico es de esta forma incrementado con respecto a la utilización de la llama sola. Los tubos de absorción pueden tener forma de T o estar abiertos en los extremos, como se muestra en la **figura 1.1**.

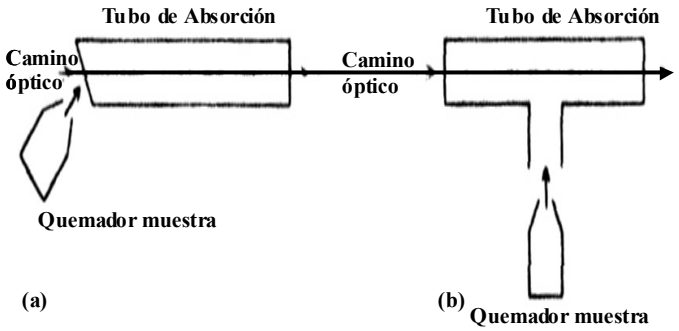


Figura 1.1: Diferentes modelos de Tubo de Absorción de Larga Trayectoria, (a) abierto en los extremos, (b) en forma de T **[20]**

Robinson **[21]** fue el primero en utilizar esta técnica para la determinación de Al en 1962, obteniendo unos resultados de sensibilidad muy satisfactorios. Muchas veces se pueden presentar problemas de scattering o absorción de fondo que pueden ser corregidos con el uso de dos fuentes de luz, una lámpara de cátodo hueco para medir la absorción total a la longitud de onda adecuada y otra lámpara de hidrógeno para la corrección de fondo. La sensibilidad no es proporcional a la longitud del tubo. Normalmente se usan tubos de sílice, alúmina o cerámica de 1m de longitud. Existen numerosas aplicaciones del Tubo de Absorción de Larga Trayectoria con espectrometría de absorción atómica para análisis cuantitativos de una gran variedad de muestras, debido a los buenos resultados de sensibilidad, aunque no es un método comercializado.

La técnica de Delve´s cup micromuestra combina dos ideas, la introducción mecánica de la muestra en la llama en un bote o copa, con la colección del vapor atómico en un tubo de absorción que está sobre la llama como se muestra en la **figura 1.2**:

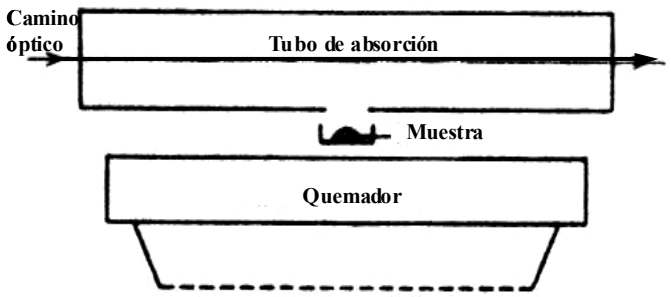


Figura 1.2: Sistema Delve's cup **[20]**

Esta técnica ha sido utilizada para la determinación de metales en muestras de sangre de 10 µl de volumen. En este sistema la muestra se coloca en una copa de níquel de 10 mm de

diámetro externo y 5 mm de altura y se vaporiza en un tubo de absorción con aperturas en los extremos. Se obtuvieron resultados de alta sensibilidad usando muestras pequeñas, que se pueden atribuir al aumento del tiempo de permanencia de los átomos en la llama y al incremento en la eficiencia de la transferencia de la muestra. Los tubos de absorción pueden ser de sílice, cerámica, alúmina, mientras que las copas pueden ser de acero inoxidable, cerámica o cuarzo. La técnica fue usada tanto para muestras clínicas como industriales, siendo la determinación más efectiva para metales volátiles como el Cd y Pb en niveles de sub-partes por millón en materiales biológicos semejantes a la sangre. **[20]**

Nos centraremos en este trabajo en la utilización de la tercera técnica, a saber, Tubo Atrapa Átomos. En este sistema la sensibilidad se ve mejorada debido a que aumenta el tiempo de residencia de los átomos en el camino óptico, a la lenta velocidad de la llama, así como al largo camino óptico. El primero en utilizar esta técnica tal y como se practica hoy en día fue *Watling et al.* **[22]**. El sistema se basa en un tubo de cuarzo calentado con dos ranuras (STAT, *Slotled Tube Atom Trap*), una en la parte superior y otra en la parte inferior, como se muestra en la **figura 1.3**. La ranura de entrada está sobre el quemador a 120° de la ranura de salida. *Hansen et al.* **[23]** modificó dicho tubo aumentando el ángulo a 180°. *Watling et al.* **[22]** usaron esta técnica para determinar As, Sb, Se y Hg con llamas de aire-acetileno, aire-hidrógeno y argón y compararon los resultados obtenidos con cada una de las llamas en presencia y en ausencia del STAT, así como las posibles interferencias. Dichos resultados se traducían en un incremento tanto en precisión como en sensibilidad. Este método es aplicable sobre todo a elementos volátiles tales como Cd, Sb, As, Ag, Bi, Se, Sn **[20]**.

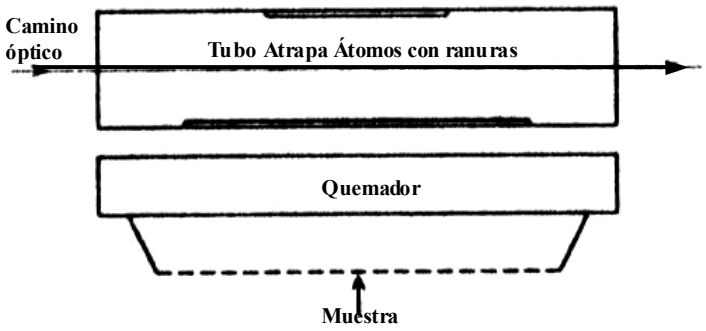


Figura 1.3: Tubo Atrapa Átomos con Ranuras descrito por *Watling et al.* **[20]**

Burns et al. realizaron modificaciones y optimizaciones sobre el tubo de cuarzo, sustituyendo la ranura superior por 6 agujeros centrados sobre la ranura de entrada (**figura 1.4**). Estes autores determinaron Sn en joyas a base de zirconio **[24]**, a base de cobre **[25]**, y Sb, también en joyas, a base de cobre **[26]**. La mejor posición del STAT fue a 8 mm de la cabeza del quemador. Los resultados obtenidos muestran en los tres casos una mejora en relación a la sensibilidad, límites de detección y precisión. Este mismo STAT modificado fue utilizado por dichos investigadores para la determinación de Sn en joyas a base de cobre con espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, obteniéndose resultados favorables en cuanto a la sensibilidad y precisión **[27]**.



Figura 1.4: Tubo atrapa átomos modificado por *Burns et al.*

En la bibliografía se pueden encontrar aplicaciones de los STAT de cuarzo para la generación de hidruros **[28]**, la nebulización discreta **[29]**, empleando un nebulizador ultrasónico **[30]**, y para sistemas de inyección en flujo (FI, *Flow Inyection*) **[31]**. Con este último sistema, se incrementa el tiempo de vida del tubo. Así, investigadores como *Xu et al*. **[31]** encontraron que con el uso de FI el tiempo de vida del tubo de cuarzo con ranuras mejoraba cuando se estudiaban muestras agresivas como la orina. Se ha utilizado también la combinación espectrometría de absorción atómica de llama – tubo atrapa átomos con ranuras (FAAS-STAT, *Flame Atomic Absorption Spectrometry - Slotled Tube Atom Trap)* para la determinación de especies de As en una llama de Ar-H. *Hansen et al.* **[23]** usaron AAS-STAT de Llama y STAT con espectrometría de plasma acoplado por inducción para la determinación de siete compuestos de As separados previamente mediante cromatografía líquida de alta resolución, obteniéndose resultados muy positivos en relación con la sensibilidad y límites de detección. *Burns et al*. **[28]** usaron para la determinación de Bi en joyas a base de cobre, un sistema del tipo AAS-STAT de Llama con y sin generación de hidruros, mejorándose con el uso de este sistema de atrapamiento atómico la precisión en comparación con el uso de la llama convencional. El mismo método fue utilizado por

Yaman et al. **[32]** para el estudio de la concentración de Pb en suelo y su relación con la concentración de este mismo elemento en frutas. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante determinación en horno de grafito viéndose que existe una concordancia del 91%. *Moffett* **[33]** estudió el aumento en la sensibilidad en la absorción atómica de llama aire-acetileno con el uso de un tubo atrapa átomos para la determinación de Cd y Pb en muestras medioambientales. Los resultados obtenidos indican un notable incremento de la sensibilidad y una mejora de los límites de detección. *Yaman* **[34]** determinó Cd y Pb en orina humana por AAS-STAT de Llama después de un proceso de enriquecimiento en carbón activo, obteniéndose un aumento en la sensibilidad debido al uso del STAT y del procedimiento de enriquecimiento. Estos mismos autores aplicaron la técnica FAAS-STAT para determinar Pb, Cd y Ni en fangos y aguas residuales y Cu en tejidos tiroideos humanos **[35, 36]**.

Las principales ventajas que presenta el uso del STAT es un incremento en la sensibilidad y precisión y una reducción de las interferencias y puede ser usado en un amplio rango de muestras. Los tubos fueron inicialmente fabricados de sílice, pero es posible el uso de otros materiales tales como acero inoxidable o grafito. Normalmente, están hechos de cuarzo debido a su alto punto de fusión y a su bajo coeficiente de expansión térmico, además su manufactura es fácil y barata **[20]**. *Khalighie et al.* **[37]** investigaron la posibilidad de usar tubos hechos de titanio, níquel y cobre, pero el uso de estos no es muy adecuado debido a los compuestos intermetálicos que se pueden formar, además de las distorsiones que sufren después de unos pocos ciclos de enfriamiento-calentamiento.

Otro modelo de tubo atrapa átomos es el Tubo Atrapa Átomos con Refrigeración de Agua (WCAT, *Water Cooled Atom Trap*), que permite una preconcentración in situ de los átomos de analito formados en la llama por su adsorción sobre el tubo frío (**figura 1.5**). El procedimiento es el siguiente: el tubo, que está posicionado sobre el quemador, de modo que la radiación emitida por la fuente de luz pasa por encima de éste, es enfriado por un rápido flujo de agua fría que pasa a través de él. Una vez que se pone en marcha el flujo de líquido, los átomos se condensan sobre su superficie para luego excitarse absorbiendo radiación de la fuente. Se obtienen así mejores señales debido a la concentración del analito **[20]**.

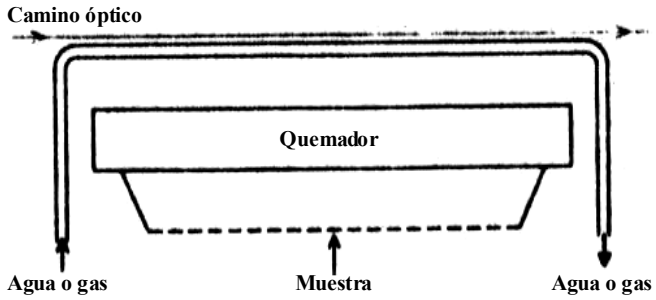


Figura 1.5: Tubo Atrapa Átomos con Refrigeración de Agua **[20]**

Se han publicado estudios en los que se utilizaron técnicas de simple o doble tubo atrapa átomos, como los realizados por *Hallam* y *Thompson* **[38]** para la determinación de Cd y Pb en agua potable por absorción atómica de llama de aire acetileno. Estudiaron los efectos producidos sobre los resultados con diferentes recubrimientos del tubo, encontrando mejores datos para el Cd si el recubrimiento es óxido de vanadio (III). Los resultados se compararon con los obtenidos en horno de grafito, no obteniéndose diferencias entre las dos técnicas. *Ellis* y *Roberts* **[39]** utilizaron un WCAT de doble tubo doblado para determinar As, Sb, Cr y Mn. Estes autores optimizaron distintos parámetros como el flujo del combustible, la altura del tubo sobre el quemador y los tiempos de atomización sobre la superficie de sílice de los tubos, que dependen de las propiedades físicas de los elementos; hicieron además una comparación de los resultados obtenidos con la llama convencional y con un sistema WCAT plano. Por otro lado *Roberts* y *Kahokola* **[40]** realizaron estudios detallados sobre la optimización del WCAT y encontraron que uno de los parámetros que más afectaba a la sensibilidad era la altura del tubo sobre el quemador. *Sun Han-wen et al.* **[41]** determinaron Pb y Cd en orina por espectrometría de absorción atómica derivada usando un WCAT de acero inoxidable. Estudiaron los efectos de la posición del tubo, las condiciones de la llama, el tiempo de colección y el efecto del flujo de agua.

Las ventajas más obvias que presenta el WCAT son su bajo costo, su uso simple y su gran aplicabilidad a especies metálicas y metaloides **[20]**. *Matusiewicz et al*. **[42]** compararon el uso de WCAT y STAT para la determinación de diversos elementos traza en agua de río y de estuario. Para el WCAT con 2 minutos de colección los límites de detección para Cu, Mn y Zn fueron de 0,9 ng/ml, 1,5 ng/ml y 0,3ng/ml, respectivamente. Con el STAT los valores obtenidos fueron 4,0 ng/ml, 12,1 ng/ml, 2,0 ng/ml y 1,2 ng/ml, para Cu, Fe, Mn y Zn, respectivamente. La combinación de un STAT y un WCAT da lugar un sistema que ofrece una alta sensibilidad y precisión

denominado Tubo Atrapa Átomos con Ranuras y con Sistema de Refrigeración de Agua (STWCAT, *Slotled Tube Water Cooled Atom Trap*) **[20]**. Este sistema se puede observar en la **figura 1.6**.

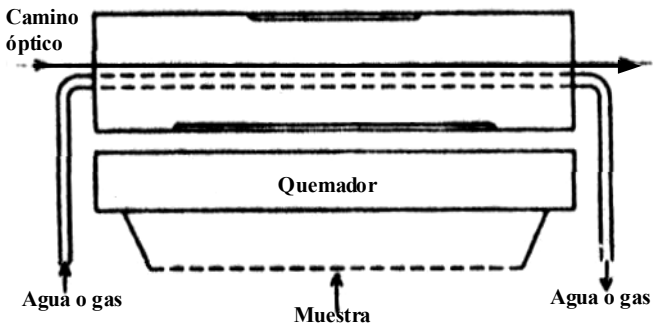


Figura 1.6: Tubo Atrapa Átomos con Ranuras y sistema de Refrigeración de Agua **[20]**

Turner y *Roberts* **[43]** utilizaron un STAT y un STWCAT para determinar Pb y Cd en agua de río. Los resultados obtenidos fueron analizados y comparados, llegando a la conclusión de que con el uso del STWCAT los valores de la sensibilidad son los más óptimos.

Podemos citar otros diseños de sistemas de atrapamiento como el descrito por *Ramakrishna et al.* **[44]** los cuales determinaron Cr, Cd y Zn en aguas potables por absorción atómica de llama usando un tubo de cuarzo en forma de "T" que se adaptaba a la llama y que ofrecía mejoras en cuanto a lo que a la sensibilidad se refiere (**figura 1.7**).

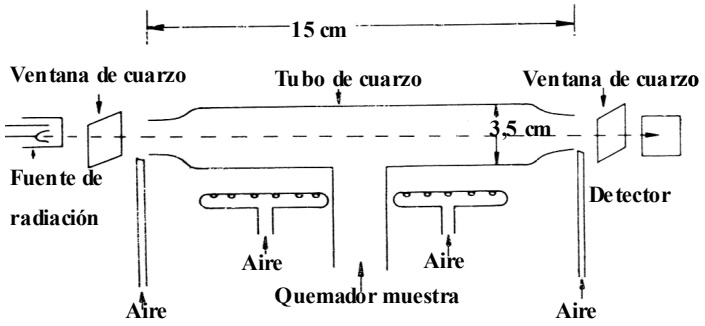


Figura 1.7: Tubo en forma de T usado por *Ramakrishna* **[44]**

Todos estos dispositivos pueden ser considerados como trampas de átomos integrados (IAT, *Integrated Atom Traps*) tal y como han sugerido *Matusiewicz* y *Kopras* **[45]**.

Investigaciones más recientes como las realizadas por *Korkmaz et al.* tratan sobre el estudio de los procesos de revolatización producidos en la superficie de los tubos. Principalmente existen dos métodos de revolatización, el de llama alterada y el de aspiración de disolvente. El primero consiste en cambiar la composición de la llama después de que se produzca el atrapamiento y el segundo en la aspiración de un disolvente orgánico, normalmente metilisobutilcetona (MIBC) también una vez que se atrapan los átomos en la superficie del tubo. Estos autores investigaron el proceso de revolatización con disolventes orgánicos y la influencia de la temperatura en dicho proceso así como el efecto de la relación C/O en un STAT y en un WCAT. Como conclusiones la temperatura y el incremento de ésta no está relacionado con el aumento de la revolatización, mientras que va a ser importante la relación C/O **[46]**. En otro trabajo, estos mismos autores establecieron las características analíticas en el procedimiento de determinación de Cd y Pb en aguas, mediante STAT, WCAT y STWCAT. Utilizaron como procesos de revolatización tanto el de llama alterada como el de disolvente orgánico, y optimizaron parámetros como la altura del quemador al tubo, volumen de disolvente orgánico o velocidad de aspiración. Observaron que el uso de las dos técnicas de revolatización anteriormente citadas ofrece ventajas en cuanto a la vida media del tubo. Además, el proceso es fácilmente automatizable y de fácil aplicación. Por otro lado, la relación señal/ruído no resultó importante a menos que se trabaje con el WCAT, y el mejor sistema es el de STAT porque es el más sencillo y ofrece unas características analíticas para el Pb y el Cd mejores **[47]**. En otro trabajo, los mismos autores estudiaron el efecto de las interferencias causadas por diferentes iones en la determinación de Bi, Cd, Pb, In, y Sb **[48]**.

Si el tubo es de cuarzo, éste puede sufrir procesos de divitrificación que comienzan generalmente alrededor de la ranura de entrada **[33]**. Este proceso se ve acelerado cuando están presentes metales del grupo I y II **[31, 33]**. Se ha llegado a la conclusión, tras la realización de numerosos estudios, que se puede aumentar la vida del tubo mediante la realización de un paso de recubrimiento del mismo por aspiración de una disolución de lantano, en forma de $LaCl_3$, $La(NO_3)_3$, o La_2O_3, de entre 0,5 y 1% **[20, 23, 33-36, 38, 40]**. La disolución de recubrimiento también puede ser de Al, en forma de $Al(NO_3)_3$, $Al_2(SO_4)_3$ o Al_2O_3 de concentración entre 0,5-1% m/v **[31, 33, 38-40, 43]**, o de sales de V, en forma de óxido o de vanadato amónico **[38, 40, 43]**. Con el recubrimiento, además de prevenir la interacción directa de los metales alcalinos y alcalinotérreos con la superficie de la sílica, se incrementa el área de superficie efectiva para el atrapamiento de especies interferentes, lo que se traduce en un aumento de la vida útil el tubo **[38]**.

OBJETIVO

OBJETIVO

Debido a la gran importancia de todo los problemas relacionados con el Medio Ambiente y la contaminación, ya sea ésta atmosférica, acuática o terrestre, el estudio de la contaminación por metales es relevante.

El objetivo de esta parte del trabajo fue la optimización de distintos métodos de determinación de metales en muestras de mejillón de batea de la Ría de Arousa. En concreto, se desarrollaron métodos de determinación de Cu y Zn por FAAS, Cd, Cr y Pb por ETAAS y un método multielemental para Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V y Zn por ICP-OES.

Como se comentó con anterioridad, el Cd es un elemento muy volátil y que se atomiza sin ninguna dificultad, lo que hace que se pueda determinar por FAAS sin apenas presencia de interferencias. El mayor inconveniente es la baja sensibilidad asociada a la propia técnica que se debe en parte a la baja eficiencia del nebulizador y al escaso tiempo de residencia de los átomos en el camino óptico, a lo que hay que sumar la baja concentración de Cd en las muestras medioambientales. Todo esto hace que se tengan que utilizar técnicas de preconcentración como la de los tubos atrapa átomos para determinar Cd por FAAS. Así, en esta sección se estableció también como objetivo el desarrollo de métodos basados en distintos diseños de tubos atrapa átomos (STAT) para la determinación de Cd en las muestras de mejillón por STAT-FAAS.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de cloruro de arsénico (III) de 1000 µg/ml de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Disolución patrón de nitrato de níquel de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de vanadio de 997±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de estaño (II) de 1000±5 µg/ml de BDH (Poole, Reino Unido).
* Disolución patrón de cloruro de cobalto de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de silicio de 1005±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de dióxido de selenio de 1001±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de bario de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de nitrato de estroncio de 999±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de aluminio de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de hierro (III) de 1000 µg/ml (Pekin Elmer).
* Disolución patrón de nitrato de manganeso de 1000±0,002 µg/ml de Panreac (Barcelona, España).
* Disolución patrón de nitrato de magnesio de 10000 mg/l preparado a partir de nitrato de magnesio (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de paladio de 1000 mg/l (Perkin Elmer).
* Triton X-100 (Merck).
* Ticloruro de lantano ($LaCl_3.7H_2O$) (Panreac).
* Ácido nítrico 69% Hiperpure (Panreac).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Peróxido de hidrógeno 33% (p/v) (Panreac).ç
* DORM-1 (*Dogfish muscle*, músculo de tiburón) del National Research Council of Canada (Ottawa, Canadá).
* DOLT-3 (*Dogfish liver*, hígado de tiburón) del National Research Council of Canada (Ottawa, Canadá).

* TORT-1 (*Lobster Hepatopancreas*, hepatopáncreas de langosta) del National Research Council of Canada (Ottawa, Canadá).

* GBW 08571 (*Mussel*, Mejillón) del Research Center for Eco-Environmental Sciences (Pekin, China).

* Argón, Airliquide N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).

* Acetileno Airliquide N-26 (Jaime Rey).

* Nitrógeno Airliquide B-50 (Jaime Rey).

* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp. (Massachusetts, Estados Unidos).

3.2- MATERIAL

* Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 1100B de Perkin-Elmer, con corrector de fondo de lámpara de deuterio. Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Cámara de grafito HGA-400 (Perkin Elmer).
* Muestreador automático AS-40 (Perkin Elmer).
* Tubos de grafito pirolítico con plataforma L´Vov (Perkin Elmer).
* Espectrofotómetro de absorción / emisión atómica de llama modelo 3110 (Perkin Elmer) equipado con llama de aire/acetileno y nebulizador de bola de impacto.
* Espectrofotómetro de absorción / emisión atómica de llama modelo AAnalyst 200 (Perkin Elmer) equipado con llama aire/acetileno, lámpara de deuterio como sistema de corrección de la señal de fondo y nebulizador de alta precisión.
* Especrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción modelo Optima 3300 DV (Perkin Elmer).
* Muestreador AS 91 (Perkin Elmer).
* Bomba Peristáltica (Perkin Elmer).
* Tubos atrapa átomos de tipo STAT de varios diseños, fabricados en la Unidad de Soplado de Vidrio de la Universidade de Santiago de Compostela.
* Sistema soporte de tipo universal para celdas de cuarzo de Perkin Elmer.
* Lámpara de cátodo hueco de Cr de Cathodeon (Cambridge, Reino Unido).
* Lámpara de cátodo hueco de Cd (Perkin Elmer).
* Lámpara de cátodo hueco de Cu (Cathodeon).
* Lámpara de cátodo hueco de Zn (Perkin Elmer).
* Lámpara de descarga de electrodos de Pb (Perkin Elmer).
* Fuente para lámparas de descarga modelo System 1 (Perkin Elmer).
* Agitador Vibromatic de Selecta (Barcelona, España).
* Balanza Sartorios BL 610 (Selecta).
* Balanza Sartorius BP 121 S (Selecta).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* Microondas doméstico Taurus, programable en tiempo y potencia (150-800 W) de Taurus (Barcelona, España).
* Bombas de baja presión de politetrafluoroetileno (PTFE), fabricadas en laboratorio.

* Liofilizador LYPH-LOCK6, modelo 77530 de Laboconco Corporation (Kansas City, Estados Unidos).

* Molino de bolas de tipo vibratorio, con cilindros de Zr de 15 ml de volumen y bolas de Zr de 7 mm de diámetro de Retsch (Haan, Alemania).

* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.

* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

3.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón. A continuación, se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10% en el que permanece 48 horas. Transcurrido este tiempo, el material se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q y por último se seca en estufa. Una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena.

Con respecto a la limpieza de las bombas de teflón, éstas se pueden limpiar de la forma descrita anteriormente o sometiéndolas a radiación de microondas, siendo ésta una forma más rápida. Para ello, primero se lavan con agua y jabón, y a continuación con agua Milli-Q. Se le añade a cada una 2 ml de HNO_3 al 65% y se someten a radiación de microondas hasta que el nítrico quede totalmente transparente. El nítrico se cambia cada vez que se aplica la radiación. Por último se enjuagan con agua Milli-Q y se secan en estufa.

3.4- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE *DETERMINACIÓN DE Cr, Cd, Pb, Cu y Zn EN MEJILLONES MEDIANTE ETAAS Y FAAS*

3.4.1- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MEDIDA EN ETAAS Y FAAS

Como ya se ha indicado, en este capítulo nos centraremos en la optimización de un procedimiento de determinación de metales presentes en muestras de mejillón, concretamente Cr, Cd, Pb por ETAAS y Cu y Zn por FAAS.

3.4.1.1- PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez que las muestras de mejillón de batea llegan al laboratorio, éstos se abren y se separa la valva de la vianda, juntando todas las viandas correspondientes a un mismo punto de muestreo y homogeinizando las mismas por percusión (Stomacher). Parte de la muestra homogenizada se separa para su análisis en húmedo y la parte restante se liofiliza a -40º C durante dos semanas. Una vez liofilizada la muestra (muestra en seco), se pulveriza en un molino de bolas, para tener un tamaño de partícula homogéneo. Una vez liofilizada, la muestra de mejillón se somete a un proceso de digestión en medio ácido inducido por radiación de microondas en bombas de baja presión. El procedimiento que se siguió fue el propuesto por *Bermejo Barrera et al.* **[49]** pero con modificaciones:

1. Se pesan aproximadamente 0,2 g de mejillón liofilizado o 0,7 g de mejillón húmedo, según el caso, y se introducen en una bomba de teflón de baja presión junto con 2 ml de HNO_3 69% y 0,5 ml de H_2O ultrapura.
2. Las bombas de teflón, con la muestra, el ácido y el agua, se irradian en el horno microondas durante 1 min a 200 W.
3. Las bombas se enfrían en baño de hielo durante 5 min.
4. Se repite la etapa 2 seis veces más, con etapas intermedias de enfriamiento en baño de hielo.
5. Las bombas se enfrían en baño de hielo durante 15 min.
6. Las bombas se abren y se adiciona 1 ml de H_2O_2 33% p/v.
7. Las bombas se irradian con energía de microondas a 300 W durante 1 min, repitiendo esta etapa seis veces con etapas intermedias de enfriamiento.
8. Las bombas se enfrían en baño de hielo durante 15 min.

9. El digerido se lleva a un volumen de 10 ml con agua ultrapura y se guarda en recipientes de polietileno a 4º C.

3.4.1.2- CONDICIONES ÓPTIMAS EN FAAS Y ETAAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn

Una vez obtenido el digerido, se procedió al análisis de los mismos siguiendo procedimientos de medida en FAAS y ETAAS establecidos con anterioridad. Dichas condiciones experimentales de medida para cada elemento y técnica espectrométrica seleccionada se muestran en las **tablas 1.2**, **1.3** y **1.4**.

Tabla 1.2: Condiciones espectrométricas para la determinación de Cu y Zn en digeridos de mejillón por FAAS

	λ/(nm)	**Ancho de Rendija/(nm)**	**Corriente de la lámpara/(mA)**	**Flujo de Aire/(lmin^{-1})**	**Flujo de C_2H_2/(lmin^{-1})**
Cu	324,8	0,7	15	23,5	2,0
Zn	213,9	0,7	15	23,5	2,0

Tabla 1.3: Condiciones espectrométricas para la determinación de Cr, Cd y Pb en digeridos de mejillón por ETAAS

	λ/(nm)	**Ancho de Rendija/(nm)**	**Corriente de la lámpara/(mA)**	**Corrección de Fondo**	**Modificador Químico/(mgl^{-1})**
Cr	357,9	0,7	12	Deuterio	Mg/20
Cd	228,8	0,7	8	Deuterio	Pd/20 Mg/15
Pb	283,3	0,7	10	Deuterio	Pd/20

Tabla 1.4: Programa de temperaturas para la determinación del Cr, Cd y Pb en digeridos de mejillón por ETAAS

	Etapa	Tª/ºC	Rampa/s	Tiempo/s	Flujo de Ar/(mlmin^{-1})
Cr	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	1200	10	15	300
	Atomización	2500	0	5	0
	Limpieza	2650	1	2	300
Cd	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	600	10	15	300
	Atomización	1600	0	2	0
	Limpieza	2200	2	3	300
Pb	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	800	15	10	300
	Atomización	1800	0	3	0
	Limpieza	2200	2	3	300

3.4.2 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE Cr, Cd y Pb POR ETAAS Y Cu Y Zn POR FAAS

3.4.2.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

Se realizó un estudio de la linealidad y del efecto matriz para cada uno de los elementos sometidos a estudio. Para la comprobación de la existencia o no del efecto matriz se compararon las pendientes de las rectas de calibrado y adición obtenidas en días diferentes mediante la aplicación del test ANOVA y del test de Rangos Múltiples. En la **tabla 1.5** se recogen las concentraciones de los patrones en cada una de las disoluciones empleadas para construir la recta de calibrado y adición, mientras que en la **tabla 1.6** se muestran las medias y desviaciones estándar para las rectas de calibrado y adición obtenidas para cada elemento. Los resultados estadísticos indican que no existen diferencias significativas entre las pendientes de la recta de calibrado acuoso y adición para ningún metal excepto para el Cr, para un nivel de significación del 95%. Por lo tanto, las determinaciones se pueden realizar a través de la recta de calibrado menos para el Cr que se utilizará la recta de adición.

Tabla 1.5: Concentraciones de patrón para construir las rectas de calibrado y adición

Patrón Nº	[Cr]/(µg/l)	[Cd]/(µg/l)	[Pb]/(µg/l)	[Cu]/(µg/ml)	[Zn]/(µg/ml)
1	0	0	0	0	0
2	2	0,5	5	0,5	0,05
3	4	1,0	10	1,0	0,1
4	6	2,0	20	2,0	0,2

Tabla 1.6: Pendientes de las rectas de Calibrado Acuoso y Adición expresadas como media±sd

Pendientes (l/µg)[a]/(ml/µg)[b]		
	Calibrado Acuoso	**Adición**
Cr[c]	0,020±0,001	0,026±0,004
Cd[c]	0,072±0,008	0,068±0,008
Cu[d]	0,144±0,026	0,145±0,025
Pb[e]	0,007±0,001	0,006±0,001
Zn	0,680	0,635

[a] para Cr, Cd y Pb, [b] para Cu y Zn, [c] n=5, [d] n=2, [e] n=3

3.4.2.2- SENSIBLIDAD

Un gran número de parámetros incluyendo la relación señal/ruído afectan a la sensibilidad del método instrumental. Las propiedades físicas y químicas del analito, la respuesta del analito y la composición de la matriz son otros factores que influyen en la sensibilidad. Para su medida se emplean las pendientes de las curvas de calibrado. Se puede expresar como la concentración de analito requerida para causar una respuesta instrumental **[16]**. Así un método es sensible si pequeños cambios en la concentración o cantidad del analito provocan grandes cambios en una propiedad **[10]**. Se calcula mediante distintos parámetros según la técnica de determinación que se esté utilizando.

Así, en ETAAS tenemos la masa característica, m_0, que viene definida como la concentración que proporciona una absorbancia igual a 0,0044, o la concentración que provoca un 1% de absorción. Es la capacidad de un instrumento de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de un analito, se calcula mediante la expresión:

$$m_0 = \frac{0{,}0044.20.C}{Q_{As} - Q_{Ab}} \quad \textbf{(Ec. 1.2)}$$

donde V es el volumen de muestra inyectado, C es la concentración de patrón añadida y Q_{As} y Q_{Ab} son las absorbancias correspondientes a la concentración del analito, y a un blanco, respectivamente **[50]**.

Si la determinación es por FAAS, se define la sensibilidad como la concentración que proporciona una absorbancia igual a 0,0044, o la concentración que provoca un 1% de absorción. Este valor es una medida de la pendiente de la curva de calibrado. En este caso se determina mediante la **ecuación 1.3** donde *m* es la pendiente de la recta de calibrado.

$$S = \frac{0{,}0044}{m} \quad \textbf{(Ec. 1.3) [19]}$$

3.4.2.3- CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD, Limit of Detection)

Se define el límite de detección como la mínima cantidad de analito que se puede detectar y diferenciar del blanco para un nivel de confianza dado. Matemáticamente, es igual a tres veces la desviación estándar del blanco (si el nivel de probabilidad es del 99,7%) dividido entre la pendiente de la recta de calibrado o adición **[15]**. Para calcular la desviación estándar del blanco se realizaron 10 medidas sobre el blanco en cuestión. La **ecuación 1.4** refleja la relación matemática para calcular el LOD.

$$LOD = 3\frac{\sigma_{blanco}}{m} \quad \textbf{(Ec. 1.4) [16]}$$

3.4.2.4- CÁLCULO DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (*LOQ, Limit of Quantification*)

Se define el límite de cuantificación como la concentración más pequeña de analito que se puede obtener realizando medidas cuantitativas. Matemáticamente es igual a diez veces la desviación estándar del blanco dividido por la pendiente de la recta de calibrado o adición **[50]** (**ecuación 1.5**):

$$LOQ = 10\frac{\sigma blanco}{m} \quad \textbf{(Ec. 1.5)}$$

En la **tabla 1.7** quedan recogidos los resultados de Masa Característica, Sensibilidad, Límite de Detección y Cuantificación, para la determinación de Cr, Cd y Pb por ETAAS, y .Cu y Zn por FAAS.

Tabla 1.7: Masa Característica, Sensibilidad, LOD y LOQ en la determinación de Cd, Cr y Pb (ETAAS) y Cu y Zn (FAAS) en digeridos de mejillón

	Masa Característica (pg)	**Sensibilidad (µg/ml)**	**LOD (µg/g)[a]**	**LOQ (µg/g)[a]**
Cr	3,5±0,2[b]	-	0,04	0,12
Cd	0,34±0,02	-	0,03	0,11
Pb	10,5±0,4	-	0,07	0,20
Cu	-	0,08	0,04	0,10
Zn	-	0,01	0,07	0,20

[a] Valores referidos a 0,2 g de mejillón [b] n = 4

3.4.2.5- PRECISIÓN DEL MÉTODO

Podemos definir la precisión como la habilidad para reproducir los mismos valores para un conjunto de observaciones realizadas de forma paralela **[16]** o como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión indica la medida del error aleatorio o indeterminado de un análisis, y se puede calcular mediante la desviación estándar absoluta (s), la desviación estándar relativa (RSD), la desviación estándar de la media (s_m) o por el coeficiente de variación (CV) **[15]**. Nosotros utilizaremos el CV que viene definido, en %, mediante la **ecuación 1.6**.

$$CV = \frac{\sigma}{X}100 \quad \textbf{(Ec. 1.6)}$$

donde σ es la desviación estándar para un conjunto de medidas y X es la media para dicho conjunto. Para el cálculo de la precisión, una muestra de mejillón se sometió al proceso de digestión 11 veces, midiendo por duplicado los contenidos de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn. Los resultados expresados en CV se recogen en la **tabla 1.8**.

Tabla 1.8: Precisión del método en la determinación de Cd, Cr y Pb (ETAAS) y Cu y Zn (FAAS) en digeridos de mejillón.

	Cr	**Cd**	**Pb**	**Cu**	**Zn**
CV (%)	8	7	8	9	7

3.4.2.6 EXACTITUD DEL MÉTODO: ANÁLISIS DE MATERIALES DE REFERENCIA

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de los materiales de referencia certificados DORM-1 (*dogfish muscle*), TORT-1 (*lobster hepatopancreas*) y GBW-08571 (*mussel tissue*). Para ello, se aplicó el procedimiento de digestión inducida por microondas a cinco submuestras de los distintos materiales, determinándose después por ETAAS o FAAS según el caso. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 1.9**, donde se observa la buena concordancia entre los valores de concentración experimentales y los valores certificados. Por tanto, puede concluirse que los procedimientos desarrollados conducen a resultados exactos.

Tabla 1.9: Valores certificados y encontrados en los diferentes materiales de referencia en la determinación de Cd, Cr y Pb (ETAAS) y Cu y Zn (FAAS) en digeridos de mejillón

	DORM-1		**TORT-1**		**GBW-08571**	
	Valor Cerificado µg/g	Valor Encontrado µg/g	Valor Cerificado µg/g	Valor Encontrado µg/g	Valor Cerificado µg/g	Valor Encontrado (µg/g)
Cr	3,6±0,04	3,4±0,04	2,4±0,6	2,2±0,1	0,57±0,08	0,53±0,02
Cd	0,086±0,01	0,082±0,005	26,3±2,1	25,2±0,7	4,5±0,5	4,3±0,1
Pb	0,40±0,12	0,40±0,05	10,4±2,0	10,5±0,5	1,96±0,09	2,02±0,02
Cu	5,22±0,33	5,50±0,19	439±22	429±6	7,7±0,9	7,1±0,2
Zn	21,3±1,0	20,5±0,3	177±10	170±6	138±9	133±2

3.5- DETERMINACIÓN DE Cd PRESENTE EN MEJILLONES MEDIANTE STAT-FAAS

3.5.1- PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras de mejillón se someten a los mismos procedimientos de homogenización, liofilización y pulverización descritos en el apartado 3.4.1.1. del presente capítulo. Así mismo, las muestras así tratadas se someten al proceso de digestión ácida asistido por energía de microondas descrito igualmente en el citado aparatado 3.4.1.1.

3.5.2- TRATAMIENTO DE LOS TUBOS DE CUARZO

Debido al proceso de divitrificación que sufren los tubos de cuarzo, es necesario llevar a cabo un proceso de recubrimiento de los mismos. Como ya se ha explicado, éste se puede realizar con diferentes disoluciones de sales de Al, La o V. Nosotros hemos empleado una disolución de tricloruro de lantano al 0,5% (p/v), haciendo pasar dicha disolución a través de ellos durante 5 min mediante aspiración directa en la llama.

3.5.3- ESTUDIOS PRELIMINARES

Se llevaron a cabo una serie de estudios preliminares empleando el espectrofotómetro de absorción y emisión atómica 3100 de Perkin Elmer. Dicho instrumento había resultado adecuado en la determinación de Cd y Pb en aguas por STAT-FAAS. Sin embargo, se obtuvieron imprecisiones y falta de exactitud en la determinación de Cd en digeridos ácidos de mejillones. Dicha inexactitud e imprecisión se atribuyó a la no corrección de la señal de fondo ya que el instrumento citado no poseía ningún sistema de corrección de la misma. Intentos en cuanto a la corrección del fondo basado en el empleo del método de las dos líneas resultaron satisfactorios para el empleo de algunos STAT, obteniéndose buena exactitud tras el análisis de materiales de referencia certificado. Debido a la importancia de la corrección de la señal de fondo cuando se aspiran digestiones ácidas, se decidió emplear el espectrofotómetro de absorción y emisión AAnalyst 200 de Perkin Elmer, el cual posee una lámpara de deuterio como sistema de corrección de la señal de fondo.

En la **figura 1.8** se puede ver el sistema de anclaje de los tubos STAT sobre el sistema quemador de la llama.

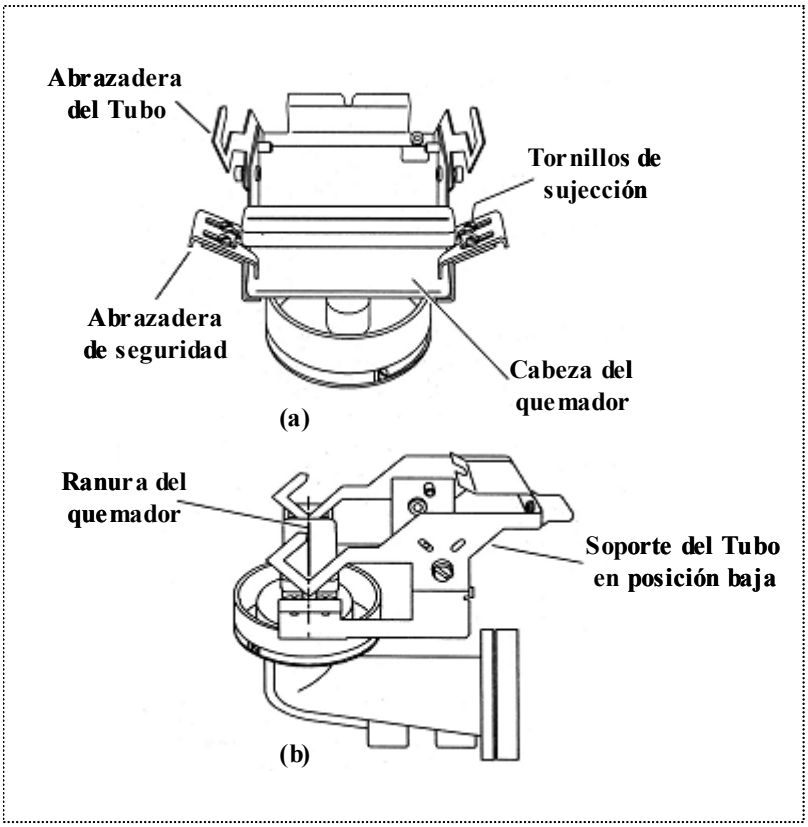


Figura 1.8: Esquema frontal y lateral del sistema de anclaje de los tubos STAT sobre el quemador

3.5.4- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE Cd EN MEJILLONES MEDIANTE STAT-FAAS

Se trabajó con seis diseños diferentes de tubos atrapa átomos de tipo STAT, que se van a denominar STAT-I, STAT-II, STAT-III, STAT-IV, STAT-V y STAT-VI. El STAT-VI es el tubo propuesto por *Hansen et al.* **[23]**, mientras que el STAT-IV fue propuesto por *Walting et al.* **[22]** y el STAT-II por *Burns et al*. **[24-28]**. Todos estos tubos fueron fabricados en cuarzo por el Servicio de Soplado de Vidrio de la Universidad de Santiago de Compostela. Los esquemas de cada uno de ellos se pueden ver en la **figura 1.9**, mientras que las dimensiones, tanto de los tubos como de las ranuras de entrada y salida se listan en la **tabla 1.10**.

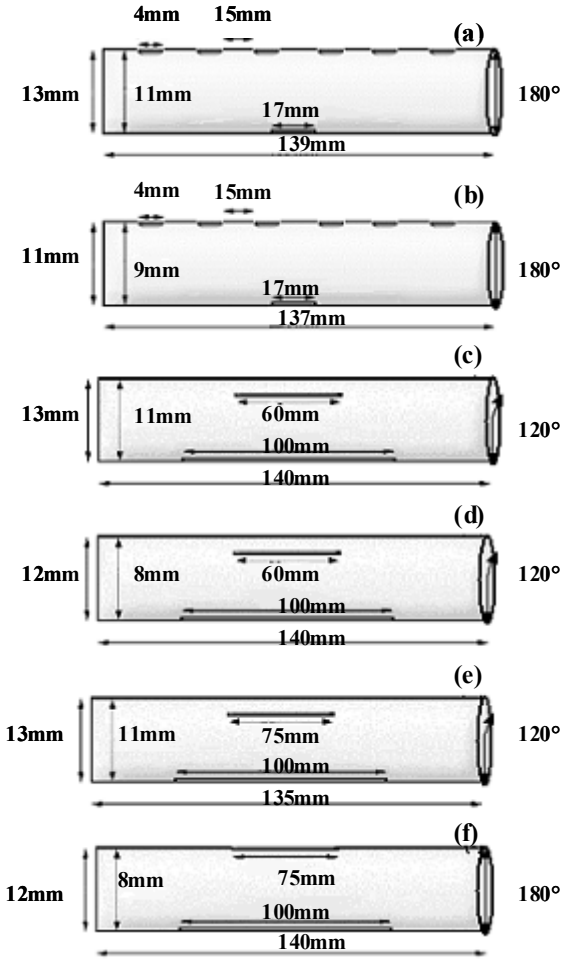


Figura 1.9: Esquema de los diferentes diseños de Tubos Atrapa Átomos STAT estudiados: a) STAT-I, b) STAT-II, c) STAT-III, d) STAT-IV, e) STAT-V, f) STAT-VI

El primer paso realizado en la optimización fue estudiar las condiciones de medida en la llama; esto es, la velocidad de aspiración, posición del quemador y flujos de aire y acetileno. Para ello, se aspiró una disolución de Cd de 0,5 mg/L, que va ser el punto más alto del calibrado, y se variaron las diferentes posiciones y flujos hasta obtener un máximo en la absorbancia. De esta forma, las condiciones espectrométricas y operacionales de la llama óptimas se resumen en la **tabla 1.11**.

Tabla 1.10: Dimensiones de los diferentes Tubos Atrapa Átomos STAT estudiados.

	Longitud/(mm)	**o.d-i.d/(mm)**	**Longitud de la ranura de la base/(mm)**	**Longitud de la ranura de salida/(mm)**	**Ángulo entre las ranuras/(º)**
STAT-I	137	13-11	17	-[a]	180
STAT-II	139	11-9	17	-[a]	180
STAT-III	140	13-11	100	60	120
STAT-IV	140	12-8	100	60	120
STAT-V	135	13-11	100	75	120
STAT-VI	140	12-8	100	75	180

[a]El STAT-I y el II, en vez de ranura superior tienen 4 agujeros de 4 mm de diámetro colocados entre ellos a una distancia de 15mm.

Tabla 1.11: Condiciones de medida para la determinación de Cd en digeridos de mejillón por STAT-FAAS

Longitud de Onda	228,8 nm
Ancho de Rendija	0,7 nm
Corriente de la Lámpara de Cátodo Hueco	8 mA
Velocidad de flujo Aire/Acetileno	6,9/2,0 L/min
Corrección de Fondo	Lámpara de D_2
Tiempo de Retraso	3 s
Réplicas	5
Rango del Calibrado Acuoso	0,0-0,5 mg/L

3.5.4.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

En el estudio de la linealidad y del efecto matriz se realizaron para cada tubo 5 rectas de calibrado y de adición. Las rectas de adición se obtienen adicionando 8 ml de la muestra digerida a disoluciones de Cd patrón que tras la dilución a 10 ml ofrecen concentraciones de Cd de 0,25, 0,35 y 0,5 μg/ml. También se llevaron a cabo rectas de calibrado acuoso y adición empleando la llama de modo convencional (sin STATs) para estudiar así el incremento de la sensibilidad con el uso de los STATs. Las pendientes medias de las rectas de calibrado acuoso y adición para cada STAT, así como para la medida directa en FAAS se recogen en la **tabla 1.12**.

Tabla 1.12: Valor medio (media ± SD) de las pendientes de las rectas de Calibrado Acuoso y Adición

	Pendiente Media±SD (ml μg^{-1})[a]	
	Calibrado Acuoso	**Adición Estándar**
Medida Convencional en FAAS	0,194±0,019	0,165±0,030
STAT-I-FAAS	0,298±0,028	0,292±0,039
STAT-II-FAAS	0,336±0,103	0,348±0,102
STAT-III-FAAS	0,520±0,080	0,502±0,071
STAT-IV-FAAS	0,635±0,160	0,644±0,153
STAT-V-FAAS	0,475±0,091	0,510±0,068
STAT-VI-FAAS	0,498±0,032	0,511±0,039

[a]n=5

Tras la aplicación del test *C* de *Cochran* al 95% para la comparación de las varianzas y el de ANOVA para comparar las medias, se deduce que sólo existe efecto matriz si la determinación se realiza de modo convencional, ya que hay diferencias significativas entre las pendientes de la recta de calibrado y la de adición. Por lo tanto, el efecto matriz disminuye con el uso de los tubos atrapa átomos.

Mediante una relación entre las medias de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada STAT y las obtenidas mediante el método convencional se calcula el incremento que se produce en la sensibilidad con el uso de los diferentes diseños de STATs. Este incremento de sensibilidad queda recogido en la **tabla 1.13**.

Tabla 1.13: Incremento en la sensibilidad en la determinación de Cd en digeridos de mejillones por STAT-FAAS

Incremento (nº veces)	
STAT-I	1,8
STAT-II	2,1
STAT-III	3,0
STAT-IV	3,9
STAT-V	3,1
STAT-VI	3,1

Observando los resultados relativos al incremento de la sensibilidad, se llega a la conclusión de que se obtienen bajos incrementos en la sensibilidad cuando la ranura de salida se sustituye por agujeros, como ocurre en el caso de los STAT-I y STAT-II. Si comparamos el STAT-III y el STAT-IV, podemos decir que a medida que se estrecha el tubo, el incremento de la sensibilidad es mayor. Por otro lado, tanto la longitud del tubo como la longitud de la ranura de entrada no influyen en la sensibilidad. Además podemos concluir que los tubos donde la ranura de entrada y de salida forma un ángulo de 120º son los que presentan mayores incrementos en la sensibilidad. Esto puede ser debido a que la llama no encuentra con facilidad la ranura de salida y debe cambiar su itinerario de forma que antes seguía un camino más recto y ahora debe curvarse. De este modo, tanto los gases que conforman la llama como los átomos de los analitos permanecen más tiempo en el interior del tubo, aumentando así la sensibilidad en comparación con el uso del tubo en el que las ranuras se encuentran formando un ángulo de 180º (STAT-VI)

Por tanto, se puede afirmar que el volumen interno (i.d, o.d) y la posición de las ranuras (formando ángulo de 120 o 180º) son los parámetros que más van a influir en el incremento de la sensibilidad. Así, si comparamos el STAT-I con el STAT-II, o el STAT-III con el STAT-IV, se ve que el más estrecho de cada par, es el que proporciona mayores incrementos. Otra característica que hay que tener en cuenta es que se observan mejores resultados, en cuanto a la sensibilidad, si tenemos ranura de salida en vez de agujeros. Por último, cabe decir que con el STAT-IV se obtiene un incremento de la sensibilidad para el Cd de 3,9 veces, valor superior al alcanzado por el tubo comercial (ACT-80) de Varian, que es 2,3 **[51]**.

3.5.4.2- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD, LOD Y LOQ

Para el cálculo de la sensibilidad, LOD y LOQ se parte de las definiciones ya expuestas en los apartados 3.4.2.2, 3.4.2.3, 3.4.2.4 del presente capítulo (**fórmulas 1.3, 1.4, 1.5**), siendo σ la desviación estándar de 11 medidas realizadas sobre un blanco y *m* la pendiente de la recta de calibrado. Los resultados se muestran en la **tabla 1.14**.

Tabla 1.14: LOD, LOQ, Sensibilidad y Precisión de los métodos

	LOD/(µg/g)	LOQ/(µg/g)	Sensibilidad/(µg/ml)	CV/(%)
Medida Convencional en FAAS	1,48	4,93	0,031	-
STAT-I-FAAS	1,16	3,87	0,013	3
STAT-II-FAAS	0,38	1,27	0,012	6
STAT-III-FAAS	0,26	0,88	0,009	6
STAT-IV-FAAS	0,27	0,90	0,006	5
STAT-V-FAAS	0,49	1,62	0,009	6
STAT-VI-FAAS	0,53	1,77	0,008	6

Para los STAT-III y STAT-IV los valores de LOD y LOQ son cuatro veces superiores a los obtenidos con la llama convencional.

3.5.4.3- ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad de todo el procedimiento. Para ello se sometió una muestra de mejillón al proceso de digestión asistido por energía de microondas y a continuación, cada digerido se analizó dos veces en cada STAT-FAAS. Una vez obtenidos los valores de concentración, la precisión se calcula mediante el coeficiente de variación (CV), **ecuación 1.6** del apartado 3.4.2.5. del presente capítulo. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 1.14**, pudiendo ver que la precisión no se ve afectada por el diseño del STAT.

3.5.4.4- ESTUDIO DE LA EXACTITUD

El cálculo de la exactitud de los métodos desarrollados para la determinación de Cd en mejillones por STAT-FAAS se llevó a cabo mediante el análisis de tres materiales de referencia DOLT-3, TORT-1, y GBW 08571. Cada material de referencia se sometió por quintuplicado al proceso de digestión y luego se determinó el Cd mediante STAT-FAAS. Los resultados se muestran en la **tabla 1.15**.

Tabla 1.15: Resultados del análisis de los diferentes materiales de referencia

	GBW 08571	**DOLT-3**	**TORT-1**
Valor Certificado/(µg/g)	4,5±0,5	19,4±0,6	26,3±2,1
Valor Encontrado/(µg/g)			
STAT-I	4,6±0,3	19,7±0,3	26,3±0,4
STAT-II	4,1±0,1	18,8±0,5	24,8±0,6
STAT-III	4,9±0,1	19,4±0,4	27,8±0,7
STAT-IV	4,7±0,1	18,9±0,4	25,3±0,2
STAT-V	4,9±0,4	19,0±0,5	25,7±0,5
STAT-VI	4,1±0,2	19,6±0,2	27,0±0,6

Como se puede ver, los valores de Cd encontrados en cada material de referencia caen dentro del intervalo certificado, lo que indica que el empleo de cualquier STAT ofrece resultados exactos.

3.5.4.5- APLICACIONES

Una vez optimizadas las condiciones de medida y evaluadas las características analíticas de los métodos empleando distintos STATs, se llevó a cabo una pequeña aplicación a cinco muestras de mejillón empleando el STAT-IV, el cual ofrecía los mejores resultados en cuanto a sensibilidad. Para ello se procedió a la digestión de cada muestra y posterior determinación mediante STAT-FAAS. Los resultados de concentración de Cd encontrada en cada muestra se pueden ver en la **figura 1.10**.

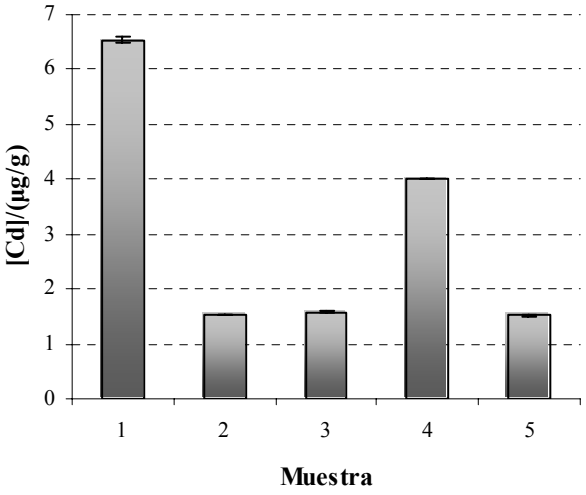


Figura 1.10: Concentraciones de Cd en las muestras de mejillón analizadas mediante STAT-FAAS (STAT-IV)

3.6- DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR ICP-OES

En este apartado se expondrán las condiciones óptimas y características analíticas en la determinación multielemental en muestras de mejillón por ICP-OES. Como paso previo de pretratamiento, se empleará el procedimiento ya descrito de digestión ácida asistido por energía de microondas (apartado 3.4.1.1.).

En estudios preliminares, se evaluaron distintas líneas de emisión para cada elemento (Al, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V y Zn), seleccionando las más adecuadas en base a criterios de sensibilidad y ausencia de interferencias espectrales. Así mismo, se estudiaron varios métodos de calibración, siendo el método de la adición estándar el que ofreció la mejor exactitud para todas las líneas estudiadas.

Las condiciones instrumentales, así como las características de la fuente plasma, se muestran en la **tabla 1.16**.

Tabla 1.16: Condiciones instrumentales y características de la fuente plasma en la determinación multielemental en digeridos ácidos de muestras de mejillón por ICP-OES

Potencia de radiofrecuencias/W	1300	
Flujo de Ar/lmin^{-1}	Plasma	15
	Auxiliar	0,5
	Nebulización	0,8
Tipo de Nebulizador	GemCone de flujo cruzado y cámara de nebulización ciclónica	
Flujo de Muestra/mlmin^{-1}	1,5	
Tiempo de Nebulización/s	45	
Número de Réplicas	4	
Disposición de medida	Axial	
Líneas de Detección	Al	396,153,
	As	188,982
	Ba	455,417
	Cd	228,802
	Co	228,616
	Cr	267,712
	Cu	327,393
	Fe	238,204
	Mn	257,610
	Ni	231,604
	Pb	220,356
	V	290,880
	Zn	213,857

3.6.1- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS EN LA DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR ICP-OES

3.6.1.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

Para el estudio de la linealidad y del efecto matriz se compararon las pendientes de las rectas de calibrado y adición, realizados en distintos días, mediante el test ANOVA, comparación de las medias, y los tests de *Barlett* y *Cochran*, comparación de las desviaciones estándar. Se observó para la mayoría de los elementos diferencias significativas en los valores medios de las pendientes de las rectas de calibrado y adición, lo que se traduce en la existencia de efecto matriz en las determinaciones por ICP-OES. Por ello se decidió utilizar el método de adición estándar en

las determinaciones. Las concentraciones de las disoluciones patrón empleadas para la construcción de las rectas de calibrado y adición se muestran en la **tabla 1.17**.

Tabla 1.17: Concentraciones de patrón multielemental para cada disolución

Patrón Nº	[ ] Patrón/(µg/ml)	Elementos
1	0	Ba
	0	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
2	0,025	Ba
	0,25	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	1,0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
3	0,05	Ba
	0,5	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	2,5	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
4	0,1	Ba
	1,0	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	5,0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
	1,5	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
5	0,15	Ba
	1,5	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	7,5	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
6	0,2	Ba
	2,0	As, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Co
	10	Al, Fe,Cu, Zn, Mn

3.6.1.2- EVALUACIÓN DE LOS LODs Y LOQs DEL MÉTODO

Los valores para el LOD y el LOQ se calcularon de acuerdo a las ecuaciones mostradas en los apartados 3.4.2.3 y 3.4.2.4. Los valores referidos a la masa de muestra seca se exponen en la **tabla 1.18**.

Tabla 1.18: LOD y LOQ del método

Elemento	LOD/(µg/g)	LOQ/(µg/g)
Al	0,52	1,75
As	2,73	9,10
Ba	0,01	0,02
Cd	0,17	0,56
Co	0,22	0,73
Cr	0,30	1,00
Cu	0,47	1,56
Fe	8,09	26,98
Mn	0,19	0,62
Ni	0,25	0,84
Pb	0,32	1,05
V	0,16	0,53
Zn	1,71	5,69

3.6.1.3- EXACTITUD DEL MÉTODO

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis del material de referencia certificado TORT-1 (*lobster hepatopancreas*). Para ello se aplicó el procedimiento de digestión inducida por microondas a cinco submuestras de dicho material certificado, determinándose después el contenido de metales por ICP-OES. En la **tabla 1.19** se muestran tanto las concentraciones encontradas como las certificadas en el material de referencia.

Tabla 1.19: Valores certificados y encontrados en el material de referencia TORT-1 para el método descrito

	Material de Referencia Certificado TORT-1	
Elemento	**Valor Certificado/(µg g^{-1})**	**Valor Encontrado/(µg g^{-1})**
As	24,6±2,2	25,6±1,1
Cd	26,3±2,1	25,0±1,0
Cu	439±22	406±15
Cr	2,4±0,6	2,7±0,4
Fe	186±11	177±8
Mn	23,4±1,0	24,2±0,4
Ni	2,3±0,3	2,6±0,1
Pb	10,4±2,0	11,0±0,3
Zn	177±10	185±2

Como se puede observar, el método es exacto para aquellos metales certificados en el material de referencia, encontrándose los valores de concentración calculados dentro del intervalo mostrado por el material de referencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han optimizado tres métodos de determinación de metales presentes en muestras de mejillón, a saber Cu y Zn por FAAS, Cr, Cd y Pb, por ETAAS, y Cr, Cd, Pb, Cu, Zn, Al, As, Ba, Fe, Mn, Ni y V por ICP-OES. Para todos los metales existe una relación lineal entre la concentración y la señal, en los rangos de concentración estudiados para cada técnica de determinación. En cuanto al efecto matriz, éste es importante tanto en la determinación multielemental por ICP-OES como en la determinación de Cr por ETAAS.

Asimismo, las características analíticas de sensibilidad, LOD y LOQ obtenidas para todos los metales por las diferentes técnicas son adecuadas, así como la precisión y la exactitud.

En cuanto a los estudios realizados sobre el uso del STAT en la determinación de Cd en mejillón, estos muestran que con el uso de todos los diseños de STAT que se han utilizado se produce un aumento en la sensibilidad del orden de 2 a 4 unidades. Hay que destacar, a su vez, que los STATs que son más estrechos, o sea los que tienen menor diámetro interno y externo, y cuyas ranuras están situadas formando un ángulo de 120º, ofrecen mejores sensibilidades, así como los que poseen ranura de salida en lugar de agujeros. La longitud de la ranura de salida y la longitud total del tubo no es una característica muy determinante. La utilización de los seis tubos permite realizar determinaciones de Cd a través de la recta de calibrado acuoso debido a la ausencia de efecto matriz. Por otro lado, con todos los STAT se obtiene una buena precisión y exactitud, siendo los tubos STAT-IV, STAT-V y STAT-VI los que presentan mejores sensibilidades.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] R. Prego, A. Cobelo, *"Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula)"*. Environmental Pollution 2003, 121, 425-452.

[2] R. Beiras, J. Bellas, N. Fernández, J. L. Lorenzo, A. Cobelo, *"Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula), metal concentrations in seawater, sediments and mussels (Mytilus Galloprovincialis) versus embryo-larval bioassays using Paracentrotus lividus and Ciona intestinalis"*. Marine Environmental Research, 2003, 56, 531-553.

[3] Y. Saavedra, A. González, P. Fernández, J. Blanco, *"A simple optimized microwave digestión method for multielement monitoring in mussel samples"*. Spectrochimica Acta Part B, 2004, 59, 533-541.

[4] L. H. J. Lajunen, P. Peramaki, *"Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emisison"*. 2ª edición 2004 Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, Reino Unido.

[5] J. F. Rubinson, K. A. Rubinson, *"Contemporary Chemical Analysis"*. 1998 Ed. Prentice-Hall. Nueva Jersey, Estados Unidos.

[6] Z. Sulcek, P. Povondra, *"Methods of Descomposition in Inorganic Analysis"*. 2000 Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.

[7] H. M. Kingston, L. B. Jessie, *"Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice"*. 1988, ACS Professional Reference Book. Washington, Estados Unidos.

[8] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín Esteban, C. P. Conde, M. Vidal, *"Toma y Tratamiento de Muestras"*. 2002, Ed. Síntesis. Madrid, España.

[9] D. Harris, *"Quantitative Chemical Analysis"*. 4ª edición 1999 Ed. W. H. Feeman. Nueva York, Estados Unidos.

[10] L. H. J. Lajunen, P. Peramaki, *"Spectrochimical Analysis by Atomic Absorption and Emission"*. 2ª edición 2004 Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, Reino Unido.

[11] D. A. Skoog and J. J. Leary, *"Análisis Instrumental"*. 4ª edición 1994 Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España.

[12] D. A. Skoog, F. J. Holler, D. M. West, *"Analytical Chemistry. An Introduction"*. 5ª edición 1990 Ed. Saunders College Publishing. Filadelfia, Estados Unidos.

[13] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *"Química Analítica"*. 1995 Ed. Mc Graw Hill. México D.C., México.

[14] J. A. C. Broekaert, *"Analytical Atomic Spectromety with Flames and Plasmas"*. 2002 Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Alemania.

[15] D. A. Skoog, F. J. Haller, T. A. Nieman, *"Principios de Análisis Instrumental"*. 2001 Ed. Mc

Graw Hill. Madrid, España.

[16] H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean, F. A. Settle, *"Instrumental Methods of Analysis"*. 6ª edición 1988 Ed. Wadsworth. California, Estados Unidos.

[17] C. W. Fuller, *"Electrothermal Atomization for Atomic Absorption Spectrometry"*. 1977 Ed. The Chemical Society. Londres, Reino Unido.

[18] G. Currell, *"Analytical Instrumentation. Performance characteristics and quality"*. 2000 Ed. Willey. Chichester, Estados Unidos.

[19] G. D. Christian, *"Analytical Chemistry"*. 4ª edición 1986 Ed. John Wiley & Sons. Estados Unidos.

[20] H. Matuisiewicz*, "Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry"* (Review). Spectrochimica Acta Part B, 1997, 52, 1711-1736.

[21] J. W. Robinson*, "Observations in atomic absorption spectroscopy"*. Analytica Chimica Acta, 1962, 27, 465-469.

[22] R. J. Watling*, "The use of a slotted quartz tube for the determination of arsenic, antimony, selenium and mercury"*. Analytica Chimica Acta, 1977, 94, 181-186.

[23] S. H. Hansen, E. H. Larsen, G. Pritzl, C. Cornett, "*Separation of seven arsenic compounds by high-performace liquid chromatography with on-line detection by hidrogen-argon flame atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectometry"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1992, 7, 629-640.

[24] D. T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, "*The determination of tin in zirconium alloys using slotted atom trap (STAT) flame atomic absorption spectrophotometry"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1992, 344, 357-359.

[25] D. T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, "*Determination of tin in copper based alloys using a modified atom trap (STAT) and flame-atomic absorption spectrophotometr"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1994, 348, 248-249.

[26] D. T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, "*Applications of a slotted tube atom trap and flame atomic absorption spectrophotometry: Determination of antimony in copper based alloys"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1994, 349, 527-529.

[27] D. T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, "*Applications of a slotted tube atom trap and flame atomic absorption spectrometry: Determination of tin in copper-based alloys after hydride generation"*. Fresenius Jouranl Analytical Chemistry, 1994, 349, 530-532.

[28] D. T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, "*Applications of a slotted tube atom trap and flame atomic absorption spectrometry: determination of bismuth in copper-based alloys with and without hydride generation"*. Analytica Chimica Acta, 1995, 311, 93-97.

[29] A. A. Brown and A. Taylor, "*Determination of copper and zinc in serum and urine by use of a slotted tube and flame atomic-absorption spectrometry"*. Analyst, 1984, 109, 1455-1459.

[30] Y. Ren. W. Shi. Q. Jin, "*Study on flame atomic absorption spectroscopy with ultrasonic nebulization-concentration sample introduction system"*. Guangpuxue Yu Guangpu Fénix, 1990, 10, 36-40.

[31] S. Xu, L. Sun, Z. Fang, "*Application of the slotted quartz tube in flow-injection flame atomic absorption spectrometry"*. Talanta, 1992, 39, 581-587.

[32] M. Yaman, Y. Dilgin, S. Gucer*, "Speciation of lead in soils and relation with its concentration in fruits"*. Analytica Chimica Acta, 2000, 410, 119-125.

[33] Jonathan Moffett, "*Sensitivity enhancement for flame atomic absorption spectrometry using an atom concentrator tube"*. Spectroscopy International, 1990, 2, 48-51.

[34] M. Yaman*, "Determination of cadmium and lead in human urine by STAT-FAAS after enrichment on activated carbon"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 275-278.

[35] M. Yaman, I. Akdeniz, *"Sensitivity ehancement in flame atomic absorption spectrometry for determination of cooper in human thyroid tissues"*. Analytical Sciences, 2004, 20, 1363-1366.

[36] M. Yaman, S. Bakirdere, *"Identification of chemical forms of lead, cadmium and nickel in sewage of waste water treatment facilities"*. Microchimica Acta, 2003, 141, 47-53.

[37] J. Khalighie, A. M. Ure, T. S. West, "*Atom-trapping absorption spectrometry with water-cooled metal collector tubes"*. Analytica Chimica Acta, 1982, 134, 271-281.

[38] C. Hallam, K. C. Thompson, "*Determination of lead and cadmium in potable waters by atom-trapping atomic-absorption spectrophotometry"*. Analyst, 1985, 110, 497-500.

[39] L. A. Ellis and D. J. Roberts*, "Further development of the "bent" tube water cooled atom trap for arsenic, antimony, copper and manganese"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1996, 11, 259-263.

[40] D. J. Roberts, K. V. Kahokola, "*Improving sensitivity and precision by automated dual silica tube atom trapping"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1989, 4, 185-189.

[41] Sun Han-Wen, Zhang De-qiang, Yang Li-li, Sun Jian-min, "*Determination of cadmium and lead in urine by derivative flame atomic absorption spectrometry using the atom trapping technique"*. Spectrochimica Acta Part B, 1997, 52, 727-734.

[42] H. Matusiewicz, R. Sturgeon, V. Luong, K. Moffatt, "*Determination of copper, iron, manganese and zinc in river estuarine water by atom trapping-flame atomic absorption spectrometry"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1991, 340, 35-40.

[43] A. D. Turner and D. J. Roberts, "*Metal determinations with a novel slotted-tube water-cooled atom trap"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1996, 11, 231-234.

[44] T. V. Ramakrishna, J. W. Robinson, P. W. West*, "Determination of copper, cadmium and zinc by atomic absorption spectroscopy"*. Analytica Chimica Acta, 1967, 37, 20-26.

[45] H. Matusiewicz, M. Kopras, "*Methods for improving the sensitivity in atom trapping flame atomic absorption spectrometry: analytical scheme for the direct determination of trace elements in beer"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1997, 12, 1287-1291.

[46] D. Korkmaz, S. Kumser, N. Ertas, M. Mahmut, O. Y. Ataman, *"Investigations on nature of re-volatization from atom trap surfaces in flame AAS"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17, 1610-1614.

[47] N. Ertas, D. Korkmaz, S. Kumser, O. Y. Ataman, *"Novel traps and atomization techniques for flame AAS"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17, 1415-1420.

[48] D. Korkmaz, M. Mahmut, R. Helles, N. Ertas, O. Y. Ataman, *"Interferences studies in slotted silica tube trap technique* Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 99-104.

[49] P. Bermejo Barrera, S. Fernández Nocelo, A. Moreda Piñeiro, A. Bermejo Barrera, *"Usefulness of enzymatic hydrolysis procedures based on the use of pronase E as sample pre-treatment for multi-element determination in biological materials"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 1893-1900

[50] M. Watty, *"Química Analítica"*. 1982 Ed. Alhambra. México.

[51] J. Moffett, *"Sensitivity enhancement for flame atomic absorption spectrometry using an atom concentrator tube, the ACT-80, Varian AA instrument at work"*. 1989, http://www.varianinc.com

CAPÍTULO II

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE METALES LIGADA A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN MUESTRAS DE MEJILLÓN

INDICE

I- OBJETIVO 137
II- PARTE EXPERIMENTAL 141
2.1- Reactivos 143
2.2- Material 144
2.3- Limpieza del material 145
2.4- Métodos de determinación de la fracción de metales ligados a sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón 147
2.4.1- Optimización de las condiciones de medida de las fracciones de Cr, Cd y Pb ligadas a sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón por ETAAS 148
2.4.1.1- Optimización de la temperatura de mineralización 148
2.4.1.2- Optimización de la temperatura de atomización 151
2.4.1.3- Optimización de la concentración de modificador de matriz 153
2.4.1.4- Optimización de la concentración de agente surfactante 157
2.4.1.5- Condiciones óptimas de medida de Cr, Cd y Pb ligados a sustancias de bajo peso por ETAAS 158
2.4.2- Optimización de las condiciones de medida de las fracciones de Cu y Zn ligados a sustancias de bajo peso molecular presentes en muestras de mejillón por FAAS 160
2.4.2.1- Optimización de los flujos de aire/acetileno 160
2.4.2.2- Optimización de la concentración de agente surfactante 160
III- CONCLUSIONES 163
IV- BIBLIOGRAFÍA 167

OBJETIVO

OBJETIVO

En este Capítulo, nos centramos exclusivamente en la optimización de los métodos de determinación de la fracción de metales (Cd, Cr, Cu, Pb y Zn) ligada a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de muestras de mejillón. Se optimizan así, para aquellos metales que se determinan por ETAAS (Cr, Cd y Pb), las temperaturas de mineralización, atomización y la cantidad de surfactante y modificador de matriz. Para los metales Cu y el Zn, ambos determinados por FAAS, se optimiza el flujo de aire/acetileno y la concentración de agente surfactante.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Tris-(hidroxietil)-aminometano de Riedel-de Haën (Steinheim, Suiza).
* 2-Mercaptoetanol (C_2H_6OS) 99% de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Fenilmetilsulfonil fluoruro ($C_7H_7FO_2S$), 99% (Fluka).
* Cloruro sódico (Merck).
* Ácido clorhídrico 37 % de J. T Baker (Deventer, Holanda).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Disolución patrón de nitrato de magnesio de 10000 mg/L preparado a partir de nitrato de magnesio (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de paladio de 1000 mg/L (Perkin Elmer).
* Disolución de Triton X-100 (Merck).
* Argón, Airliquide Ar N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).
* Acetileno Airliquide N-26 (Jaime Rey).
* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp. (Massachusetts, Estados Unidos).

2.2- MATERIAL

* Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 1100B de Perkin-Elmer, con corrector de fondo de lámpara de deuterio. Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Cámara de grafito HGA-400 (Perkin Elmer).
* Muestreador automático AS-40 (Perkin Elmer).
* Tubos de grafito pirolítico con plataforma L´Vov (Perkin Elmer).
* Espectrofotómetro de absorción / emisión atómica de llama modelo 3110 (Perkin Elmer).
* Lámpara de cátodo hueco de Cr de Cathodeon (Cambridge, Reino Unido).
* Lámpara de cátodo hueco de Cd (Perkin Elmer).
* Lámpara de cátodo hueco de Cu (Cathodeon).
* Lámpara de cátodo hueco de Zn (Perkin Elmer).
* Lámpara de descarga de electrodos de Pb (Perkin Elmer).
* Fuente para lámparas de descarga modelo System 1 (Perkin Elmer).
* Agitador Vibromatic de Selecta (Barcelona, España).
* Peachímetro Thermo Orion, modelo 720 de Orion Research (Cambridge, Reino Unido).
* Electrodo de vidrio-calomelanos Thermo Orion 8102BN (Orion).
* Centrífuga Centromix modelo 540 (Selecta).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen, modelo 2K15 de Sigma (Osterode, Alemania).
* Balanza Sartorios BL 610 (Selecta).
* Balanza Sartorius BP 121 S (Selecta).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.
* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

2.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón. A continuación, se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10%, durante al menos 48 horas. Posteriormente se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q y por último, el material se seca en estufa. Una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena.

2.4- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE METALES LIGADOS A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN MUESTRAS DE MEJILLÓN

En la determinación de la fracción de metales ligados a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de mejillón el primer paso a realizar es la optimización de las condiciones de medida. En esta primera aproximación, se emplearon las técnicas instrumentales ETAAS y FAAS, por lo que fue necesario optimizar las temperaturas de mineralización y atomización y las cantidades de agente surfactante (Triton X-100) y modificador de matriz (determinaciones por ETAAS) y los flujos aire/acetileno y concentración de agente surfactante (determinaciones por FAAS). Dado que no se ha llevado a cabo una separación cromatográfica de las proteínas similares a las metalotioneínas (MLPs, *metallotioneins like proteins*), hablaremos de sustancias de bajo peso molecular y de la fracción de metales ligados a sustancias de bajo peso molecular. Con este término englobaremos no sólo las MLPs sino también, otras sustancias de bajo peso molecular, como ácidos orgánicos, que pudieran complejar metales y que pudiesen estar presentes en el extracto citosólico.

Para la realización de este estudio se partió de extractos citosólicos obtenidos a partir de muestras de mejillón según el esquema de la **figura 2.1 [1]**.

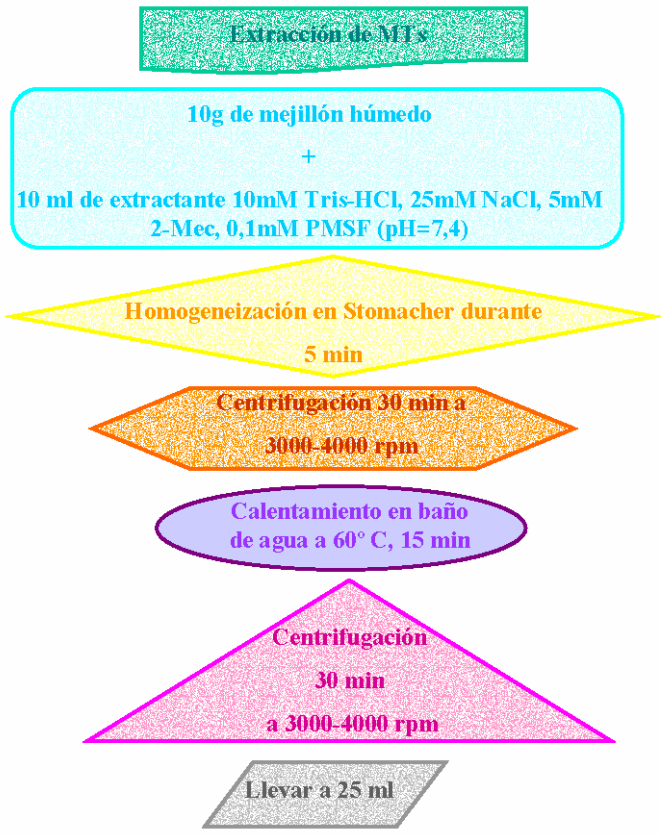


Figura 2.1: Esquema del proceso de extracción de sustancias proteínas similares a las metalotioneínas

2.4.1- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MEDIDA DE LAS FRACCIONES DE Cr, Cd y Pb LIGADAS A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR ETAAS

En primer lugar, se van a optimizar los programas de temperaturas del horno de grafito para los elementos Cr, Cd y Pb.

2.4.1.1- OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE MINERALIZACIÓN

La optimización de la temperatura de mineralización se llevó a cabo observando la variación de absorbancia con la temperatura de mineralización. Los programas iniciales de temperaturas y las condiciones de medida en la cámara son los que se muestran en las **tablas 2.1** y

2.2 [2]. Para llevar a cabo este experimento, se partió de extractos citosólicos de mejillón a los cuales se adicionaron disoluciones patrón de Cd(II), Cr(III) y Pb(II) en concentraciones de 0,5, 20 y 20 µg/l para Cd, Cr y Pb, respectivamente.

En el caso del Cr, la temperatura de mineralización se varió en el intervalo 800-1900º C, mientras que para el Cd se varió entre 400 y 1000º C, y para el Pb entre 400 y 1200º C. En todos los casos se empleó la mezcla nitrato de magnesio / nitrato de paladio como modificadores de matriz en concentraciones de 20 mg/l cada uno **[3]**. La concentración de agente surfactante (Triton X-100), utilizada en un principio para obtener una buena reproducibilidad en la inyección, fue de 0,6 %(v/v). Los resultados de absorbancia obtenidos para los tres metales se recogen en la **tabla 2.3**; asimismo, en las **figuras 2.2** y **2.3** podemos observar éstos de forma gráfica.

Tabla 2.1: Programas iniciales de temperaturas para la determinación de la fracción de Cr, Cd y Pb ligados a sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón por ETAAS

	Etapa	**Tª/ºC**	**Rampa/s**	**Tiempo/s**	**Flujo de Ar/(mlmin^{-1})**
Cr	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	1200	10	15	300
	Atomización	2500	0	5	0
	Limpieza	2650	1	2	300
Cd	*Secado*	120	10	20	300
	Mineralización	700	10	10	300
	Atomización	2300	0	4	0
	Limpieza	2500	1	3	300
Pb	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	700	15	10	300
	Atomización	1600	0	3	0
	Limpieza	2200	2	3	300

Tabla 2.2: Condiciones de medida iniciales para la determinación de la fracción de Cr, Cd y Pb ligados a las sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón por ETAAS

	λ/(nm)	**Ancho de Rendija/(nm)**	**Corriente de la lámpara/(mA)**	**Corrección de Fondo**	**Modificador Químico/(mgl^{-1})**	**TritronX-100(%)**
Cr	357,9	0,7	12	Deuterio	-	-
Cd	228,8	0,7	5	Deuterio	Pd/20 Mg/20	0,6
Pb	283,3	0,7	10	Deuterio	Pd/20 Mg/20	0,6

Tabla 2.3: Valores de absorbancia obtenidos para cada metal al variar la temperatura de mineralización

Tª de Mineralización/ºC	Absorbancia Cr	Absorbancia Cd	Absorbancia Pb
400	-	0,173	0,209
500	-	0,177	0,201
600	-	0,162	0,202
700	-	0,165	0,202
800	0,100	0,146	0,204
900	0,100	0,094	0,185
1000	0,107	0,031	0,178
1100	0,106	-	0,092
1200	0,101	-	0,008
1300	0,099	-	-
1400	0,099	-	-
1500	0,094	-	-
1600	0,095	-	-
1700	0,089	-	-
1800	0,081	-	-
1900	0,051	-	-

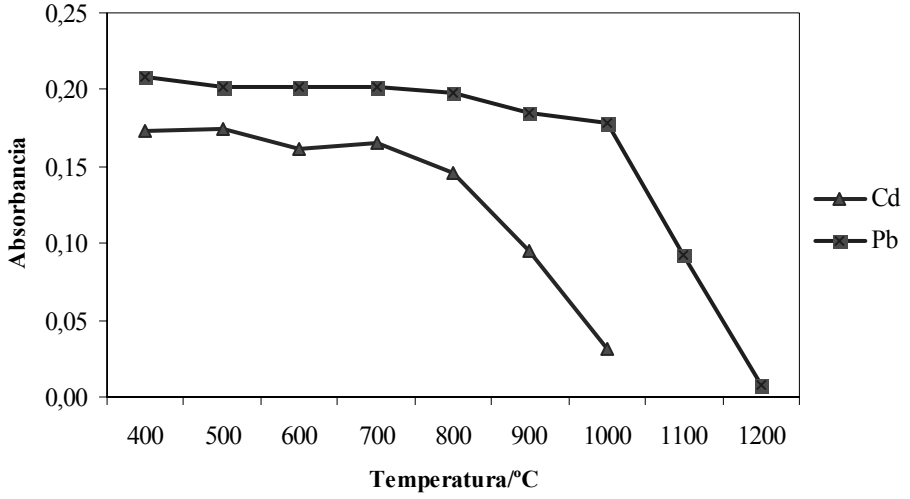


Figura 2.2: Curvas de mineralización para el Cd y Pb

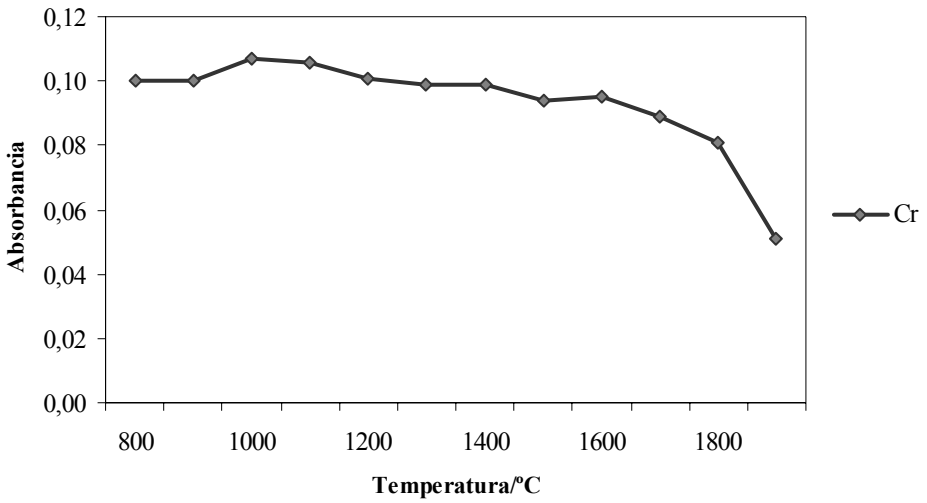


Figura 2.3: Curva de mineralización para el Cr

A la vista de los resultados, las temperaturas óptimas de mineralización son 1400º C para el Cr, 500º C para el Cd y 800º C para el Pb.

Se optimizaron también los tiempos de rampas en la etapa de mineralización para el Cd y el Pb. En ambos casos se varió ésta de 5 a 25 segundos, midiendo cada experimento por duplicado. Como valores óptimos resultaron 15 s para el Cd y 20 s para el Pb.

2.4.1.2- OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ATOMIZACIÓN

Se estudió la temperatura de atomización manteniendo constante y en sus valores optimizados las temperaturas de mineralización. Las temperaturas de atomización ensayadas para el Cr fueron entre 2000 y 2500º C, mientras que para el Cd se estudió el intervalo 1300 - 2100º C y para el Pb el rango 1300 - 1900º C. Las concentraciones de modificador de matriz, $Mg(NO_3)_2$ y $Pd(NO_3)_2$, se fijaron al valor de 20 mg/l cada uno y la concentración de Triton X-100 se mantuvo en 0,6 %(v/v). Los experimentos se llevaron a cabo empleando extractos citosólicos de mejillón a los cuales se adicionaron disoluciones patrón de Cd(II), Cr(III) y Pb(II) en concentraciones de 0,5, 20 y 20 µg/l para Cd, Cr y Pb, respectivamente. Los resultados de absorbancia obtenidos se listan en la **tabla 2.4** y en la **figura 2.4**.

Tabla 2.4: Valores de absorbancia obtenidos para cada metal al variar la temperatura de atomización

Tª de Atomización/ºC	Absorbancia Cr	Absorbancia Cd	Absorbancia Pb
1300	-	0,134	0,169
1400	-	0,170	0,227
1500	-	0,168	0,221
1600	-	0,173	0,208
1700	-	0,168	0,191
1800	-	0,164	0,190
1900	-	0,161	-
2000	0,062	-	0,125
2100	0,079	0,129	-
2200	0,096	-	-
2300	0,100	-	-
2400	0,124	-	-
2500	0,117	-	-

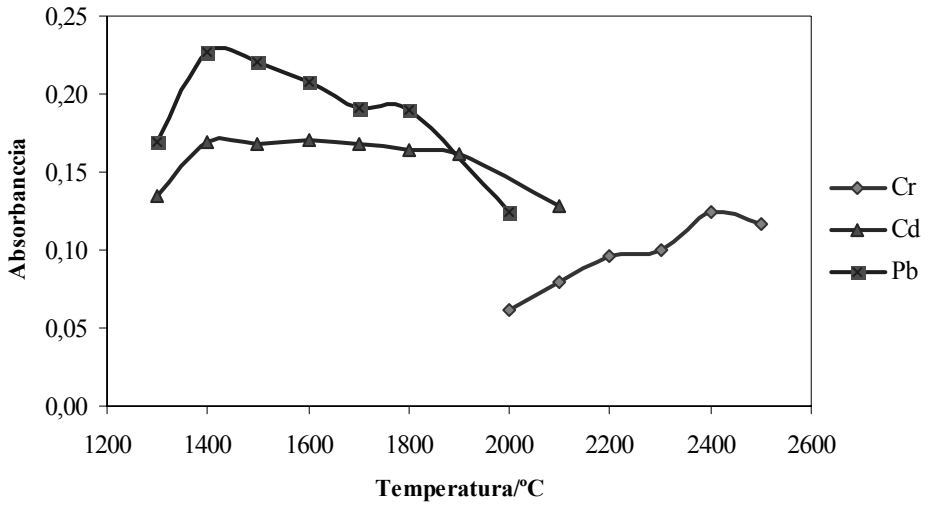


Figura 2.4: Curvas de atomización para el Cr, Cd y Pb

Según los resultados obtenidos seleccionamos como temperaturas óptimas de atomización 2400º C para el Cr, 1600º C para el Cd y 1400º C para el Pb.

2.4.1.3- OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MODIFICADOR DE MATRIZ

Se estudiaron también las concentraciones óptimas de modificadores de matriz, seleccionando la mezcla nitrato de magnesio/nitrato de paladio (modificador universal) para llevar a cabo las determinaciones de aquellos metales más volátiles (Cd y Pb) y estudiando la sal de magnesio para el Cr (metal refractario). Para este último elemento, el estudio de la cantidad de modificador de matriz se realizó de forma univariante, es decir manteniendo constante la concentración de Triton X-100 (0,6 %(v/v)) y variando la concentración de sal de magnesio. Al igual que en los aparatados anteriores, se adicionó disolución de patrón de Cr(III) a los extractos citosólicos de mejillón para obtener una concentración de este metal de 20 µg/l. Los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de nitrato de magnesio estudiada se muestran en la **tabla 2.5** y en la **figura 2.5**.

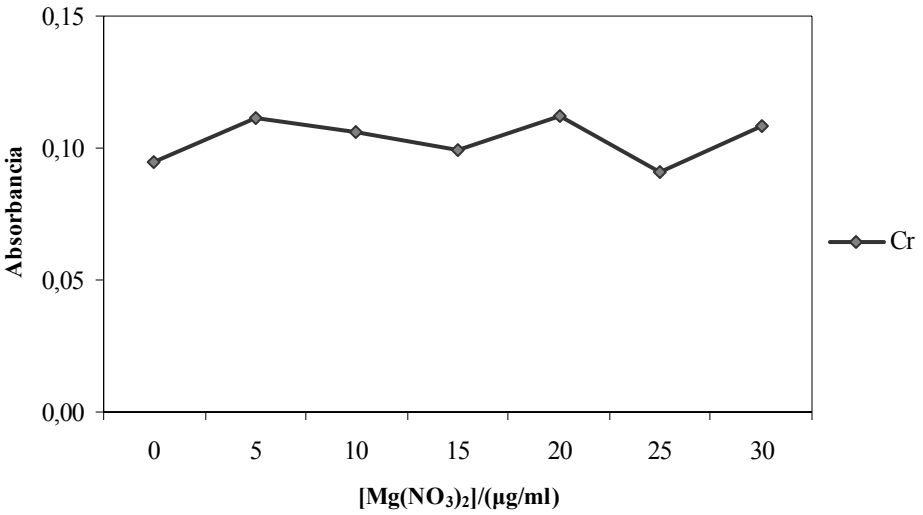


Figura 2.5: Variación de la absorbancia con la concentración de $Mg(NO_3)_2$ obtenida para el Cr

Tabla 2.5: Valores de absorbancia obtenidos para el Cr al variar la cantidad de modificador $Mg(NO_3)_2$

$[Mg(NO_3)_2]$/(µg/ml)	**Absorbancia**
0	0,095
5	0,111
10	0,106
15	0,099
20	0,112
25	0,091
30	0,108

Como se puede observar la presencia de nitrato de magnesio no mejora la señal de absorbancia. De igual forma, no se obtiene una mejora en la forma de los perfiles de absorbancia. Por lo tanto, se concluye que no es necesario el uso de modificador de matriz en la determinación de Cr ligado a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de mejillón. Este resultado es similar con estudios previos acerca de la determinación de Cr por ETAAS y se atribuye, fundamentalmente, a la naturaleza refractaria de este metal **[4]**.

Para el Cd y el Pb el estudio se llevó a cabo a través de un diseño composicional 2^2+star de 16 experimentos y dos valores centrales. En ambos casos, el diseño involucró dos variables (concentraciones de nitrato de magnesio y nitrato de paladio) y una respuesta (absorbancia de Cd o Pb). Las concentraciones de los modificadores de matriz se variaron entre 10 y 50 µg/ml para el caso del Cd y entre 20 y 100 µg/ml para el Pb. Para todos los experimentos la concentración de Triton X-100 fue de 0,6 %(v/v) y a todos extractos citosólicos se les adicionó el volumen adecuado de disolución patrón de Cd(II) y Pb(II) para tener concentraciones de ambos metales de 0,5 y 20 µg/l, respectivamente. En la **tabla 2.6** y en la **tabla 2.7** se recoge tanto la matriz de experimentos como la absorbancia de cada uno de los ellos para Cd y Pb, respectivamente.

Tabla 2.6: Diseño composicional central para la optimización de la concentración de modificador químico en la determinación de Cd ligado a las sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón

Experimento Nº	$Pd(NO_3)_2$/(µg/ml)	$Mg(NO_3)_2$/(µg/ml)	Absorbancia
1	1,8	30	0,233
2	1,8	30	0,234
3	58,2	30	0,246
4	58,2	30	0,244
5	30	1,8	0,249
6	30	1,8	0,249
7	30	58,2	0,241
8	30	58,2	0,238
9	10	10	0,232
10	10	10	0,232
11	50	10	0,241
12	50	10	0,243
13	10	50	0,254
14	10	50	0,247
15	50	50	0,254
16	50	50	0,252
Centro A	20	30	0,257
Centro B	30	30	0,255

Tabla 2.7: Diseño composicional central para la optimización de la concentración de modificador químico en la determinación de Pb ligado a las sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón

Experimento Nº	$Pd(NO_3)_2$/(µg/ml)	$Mg(NO_3)_2$/(µg/ml)	Absorbancia
1	3,6	60	0,064
2	3,6	60	0,062
3	116,4	60	0,064
4	116,4	60	0,071
5	60	3,6	0,056
6	60	3,6	0,057
7	60	116,4	0,038
8	60	116,4	0,040
9	20	20	0,069
10	20	20	0,068
11	100	20	0,076
12	100	20	0,075
13	20	100	0,072
14	20	100	0,072
15	100	100	0,073
16	100	100	0,070
Centro A	60	60	0,069
Centro B	60	60	0,070

Las superficies de respuesta obtenidas para estos resultados se representan en las **figuras 2.6** y **2.7** para Cd y Pb, respectivamente. Se puede ver como resultados óptimos para el Cd una concentración de 30 µg/ml de nitrato de paladio y 30 µg/ml de nitrato de magnesio. Para el Pb, la concentración adecuada de nitrato de paladio es 110 µg/ml y la de nitrato de magnesio 45 µg/ml.

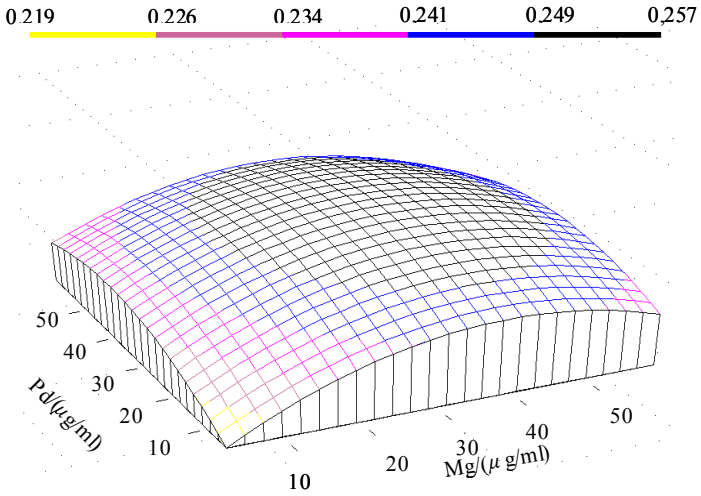


Figura 2.6: Superficie de respuesta para el Cd en el estudio del uso de modificador de matriz

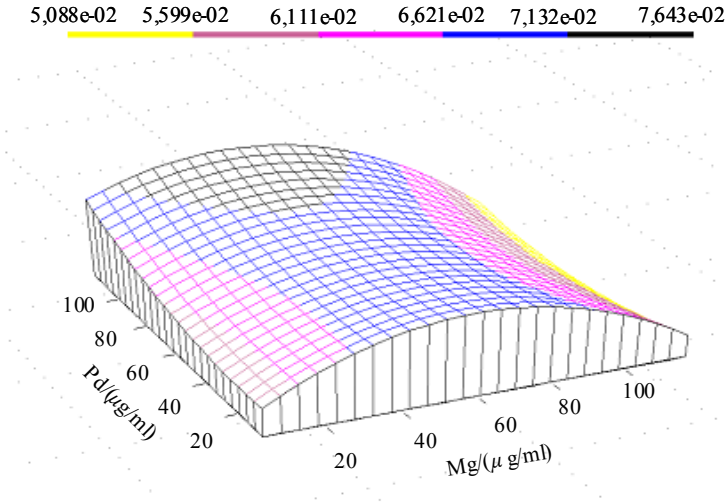


Figura 2.7: Superficie de respuesta para el Pb en el estudio del uso de modificador de matriz

2.4.1.4- OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AGENTE SURFACTANTE

Se estudió el efecto que distintas concentraciones de Triton X-100 tenía sobre la estabilidad de la disolución y la precisión de la inyección. Así, diferentes concentraciones de este agente surfactante se añadieron a la muestra, inyectando cada disolución por quintuplicado. La media y la desviación estándar de las absorbancias obtenidas para cada metal se recogen en la **tabla 2.8**.

Tabla 2.8: Valores de la absorbancia media y desviación estándar obtenidas para cada metal en cada experiencia realizada para la optimización de la concentración de surfactante

[Triton X-100] %(v/v)	Absorbancia Cr media±σ	Absorbancia Cd media±σ	Absorbancia Pb media±σ
0,00	0,106±0,004	0,265±0,027	0,081±0,007
0,05	0,101±0,003	-	-
0,10	0,100±0,004	-	-
0,20	0,101±0,005	0,251±0,009	0,081±0,004
0,30	0,099±0,004	-	-
0,40	0,101±0,004	0,222±0,033	0,080±0,003
0,60	-	0,244±0,004	0,081±0,001
0,80	-	0,241±0,004	0,083±0,003
1,00	-	-	0,081±0,003

Las desviaciones estándar de cada experimento se compararon estadísticamente mediante la aplicación de los tests estadísticos de *Bartlett* y *Cochran* para ver si existía diferencia significativa entre ellas para un nivel de confianza del 95%. Para el Cr, la aplicación de los tests reveló que no existían diferencias significativas entre las desviaciones estándar de los resultados, por lo que la presencia de Triton X-100 no ofrece ninguna mejora en la precisión de los resultados. Por el contrario, el estudio reveló que tanto para el Cd como para el Pb, sí existían diferencias significativas entre las desviaciones estándar, siendo éstas menores a medida que aumenta la concentración de Triton X-100 (**tabla 2.8**). Por tanto, se seleccionó como concentración de Triton X-100 adecuada aquella que proporcione un CV menor, resultando para el Cd una concentración de Tritón X-100 del 0,8%(v/v) y para el Pb de 0,6% (v/v).

2.4.1.5- CONDICIONES ÓPTIMAS DE MEDIDA DE Cr, Cd y Pb LIGADOS A SUSTANCIAS DE BAJO PESO POR ETAAS

Las condiciones óptimas de medida para la determinación de las fracciones de Cr, Cd y Pb ligados a las sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de muestras de mejillón por ETAAS se recogen en las **tablas 2.9** y **2.10**.

Tabla 2.9: Condiciones de medida para la determinación de la fracción de Cr, Cd y Pb ligados a las sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de muestras de mejillón por ETAAS

	λ/(nm)	Ancho de Rendija/(nm)	Corriente de la lámpara/(mA)	Corrección de Fondo	Modificador Químico/(mgl^{-1})	TritronX-100(%)
Cr	357,9	0,7	12	Deuterio	-	-
Cd	228,8	0,7	5	Deuterio	Pd/30 Mg/30	0,8
Pb	283,3	0,7	10	Deuterio	Pd/110 Mg/45	0,6

Tabla 2.10: Programas de temperatura para la determinación de la fracción de Cr, Cd y Pb ligados a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de muestras de mejillón por ETAAS

	Etapa	Tª/ºC	Rampa/s	Tiempo/s	Flujo de Ar/($mlmin^{-1}$)
Cr	*Secado*	150	20	20	300
	Mineralización	1400	10	15	300
	Atomización	2400	0	5	0
	Limpieza	2650	1	2	300
Cd	*Secado*	150	20	20	300
	Mineralización	500	15	25	300
	Atomización	1600	0	4	0
	Limpieza	2200	1	3	300
Pb	*Secado*	150	15	20	300
	Mineralización	800	20	10	300
	Atomización	1800	0	3	0
	Limpieza	2200	2	3	300

2.4.2- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MEDIDA DE LAS FRACCIONES DE Cu y Zn LIGADOS A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR PRESENTES EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR FAAS

Los parámetros que se optimizaron para la determinación de las fracciones de Cu y Zn ligados a las sustancias de bajo peso molecular por FAAS fueron los flujos de aire/acetileno y la concentración de agente surfactante Triton X-100. En todos los casos se emplearon extractos citosólicos de mejillón obtenidos según el esquema de la **figura 2.1** a los cuales se les adicionó Triton X-100 a una concentración de 0,6 %(v/v).

2.4.2.1- OPTIMIZACIÓN DE LOS FLUJOS DE AIRE/ACETILENO

La optimización de los flujos de aire/acetileno se llevó a cabo de forma univariante, manteniendo constante el flujo de aire cuando se optimizó el flujo de acetileno y viceversa. Para ambos metales, se requirió el empleo de una llama oxidante. Los resultados óptimos, junto con el resto de parámetros instrumentales en FAAS se muestran en la **tabla 2.11**.

Tabla 2.11: Condiciones de medida para la determinación de las fracciones de Cu y Zn ligados a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos de muestras de mejillón por FAAS

	λ/(nm)	**Ancho de Rendija/(nm)**	**Corriente de la lámpara/(mA)**	**Flujo de Aire/(lmin^{-1})**	**Flujo de C_2H_2/(lmin^{-1})**
Cu	324,8	0,7	15	14	2,0
Zn	213,9	0,2	15	14	1,5

2.4.2.2- OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AGENTE SURFACTANTE

Al igual que en el caso de los metales determinados mediante ETAAS, para el Cu y el Zn se estudió también si era necesario el uso del agente surfactante Triton X-100. Las concentraciones de Triton X-100 con las que se trabajó fueron 0, 0,33 y 0,66 %(v/v), las cuales fueron adicionadas a distintas submuestras de un mismo extracto citosólico. Cada uno de los extractos citosólicos con cada concentración de Triton X-100 se determinaron 10 veces siendo los resultados obtenidos, expresados como media ± σ, los mostrados en la **tabla 2.12**.

Tabla 2.12: Efecto de la concentración de Triton X-100 en la determinación de las fracciones de Cu y Zn ligados a las sustancias de bajo peso molecular en muestras de mejillón por FAAS

[Triton X-100] µg/ml	Absorbancia Cu media±σ	Absorbancia Zn media±σ
0,00	0,293±0,002	0,544±0,005
0,33	0,298±0,001	0,532±0,004
0,66	0,297±0,001	0,554±0,005

Tras la aplicación de los tests de *Bartlett* y *Cochran* se comprobó que no existían diferencias significativas entre las desviaciones estándar de los resultados para un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, se concluye que no es necesario el uso de Triton X-100 para estabilizar el extracto citosólico previa a la determinación de Cu y Zn por FAAS.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han optimizado los procedimientos de determinación de las fracciones de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligados a las sustancias de bajo peso molecular, presumiblemente proteínas similares a las metalotioneínas, en muestras de mejillones por ETAAS y FAAS.

Las temperaturas de mineralización óptimas para cada uno de los metales determinados por ETAAS son 1400º C para el Cr, 500º C para el Cd y 800º C para el Pb; mientras que las de atomización fueron 2400º C para el Cr, 1600º C para el Cd y 1400º C para el Pb. En cuanto al estudio del uso de modificador de matriz, para el Cr éste no es necesario mientras que para el Cd los resultados de concentración tanto de nitrato de paladio como de nitrato de magnesio fueron de 30 μg/ml. Para el Pb éstos fueron de 110 μg/ml de nitrato de paladio y 45 μg/ml de nitrato de magnesio. Por otro lado, el empleo de agente surfactante Triton X-100 fue necesario en las determinaciones de Cd y Pb. Esto es debido a que ambos metales se encuentran en muy baja concentración en el extracto citosólico, siendo necesario llevar a cabo las determinaciones empleando el extracto citosólico sin apenas dilución. En este caso, la precisión con la inyección mejora notablemente cuando al extracto citosólico se le añade Triton X-100 a concentraciones de 0,8 %(v/v) para el Cd y 0,6 %(v/v) para el Pb.

Los flujos óptimos de aire/acetileno para la determinación de Cu y Zn por FAAS son 14/2 ml/min para Cu y 14/1,5 ml/min para el Zn. Además en la determinación de estos dos metales tampoco es necesario el empleo de Triton X-100.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] C. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, H. Goenaga Infante, M .L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Improved separation of rabbit liver metallothioneins by FPLC-ICP-MS: a comparison with the conventional anion-exchange chromatography"*. Analusis, 2000, 28, 351-357.

[2] P. Bermejo Barrera, O. Muñiz Naveiro, A. Moreda Piñeiro, A. Bermejo Barrera, "*The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry*". Analytica Chimica Acta, 2001, 439, 211-227.

[3] Manual de trabajo "*Analytical Methods for Furnace Atomic Absorption Spectrometry*" de Perkin Elmer, 1987.

[4] B. Welz, M. Sperling, "*Atomic Absorption Spectrometry*" 3^{era} edición 1999 Ed. Wiley-VCH Verlag. Weinheim, Alemania.

CAPÍTULO III

ESPECIACIÓN DE LAS ISOFORMAS MLP-I Y MPL-II EN MUESTRAS DE MEJILLÓN POR HPLC Y DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN METÁLICA LIGADA A ÉSTAS POR HPLC-ICP-OES

INDICE

I- INTRODUCCIÓN 175
1.1- Métodos de separación y determinación de proteínas 177
1.1.1.- Métodos de separación y determinación de metalotioneínas 178
1.1.1.1.- Métodos de separación y determinación por electroforesis capilar 180
1.1.1.2.- Métodos de separación y determinación por técnicas polarográficas 180
1.1.1.3.- Métodos de separación y determinación por técnicas cromatográficas 181
1.1.2- Métodos de separación cromatográfica 184
1.1.2.1- Cromatografía líquida de alta resolución 190
1.1.2.1.1- Cromatografía líquida de cambio iónico 193
II- OBJETIVO 195
III- PARTE EXPERIMENTAL 199
3.1- Reactivos 201
3.2- Material 202
3.3- Limpieza del material 203
3.4- Optimización de la separación cromatográfica de las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** en extractos citosólicos de mejillón 205
3.4.1- Optimización de la composición de fase móvil en la separación cromatográfica de las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** 205
3.4.2- Optimización del flujo de fase móvil en la separación cromatográfica de las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** 209
3.4.3- Cálculo de la reproducibildad en el tiempo de retención 212
3.4.4- Cálculo de la resolución entre picos 213
3.5- Estudio de la distribución metálica asociada a las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** por HPLC-ICP-OES *on line* 215
3.5.1- Cálculo de la repetibilidad en el tiempo de retención y en la altura de pico para los metales asociados a MLPs determinados mediante HPLC-ICP-OES *on line* 219
3.6- Estudio de la concentración metálica asociadas a las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** por HPLC-ICP-OES *off line* 219

3.6.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 220
3.6.2- Estudio de las características analíticas del método 222
3.6.2.1- Cálculo del LOD y LOQ del método 222
3.6.2.2- Cálculo de la precisión del método 223
3.6.2.3- Exactitud del método 224
3.6.3- Determinación de metales asociados a las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** en mejillones procedentes de la ría de arousa por HPLC-ICP-OES *off line* 226
IV- CONCLUSIONES 229
V-BIBLIOGRAFÍA 233

INTRODUCCIÓN

1.1- MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

En general, para la cuantificación de proteínas se pueden emplear numerosos métodos. Cabe decir que el método debe seleccionarse cuidadosamente ya que en muchas ocasiones la presencia de sustancias interferentes hace necesaria la purificación de los componentes de las proteínas. Entre los distintos métodos podemos citar los siguientes:

- Métodos espectrométricos; las proteínas muestran su máximo de absorción a 280 nm debido a la presencia de residuos de aminoácidos aromáticos También se puede utilizar la longitud de onda de 220 nm que es propia de los enlaces peptídicos.
- Métodos químicos; como el método *Kjeldahl*, mediante el cual se determina el contenido de nitrógeno de un compuesto. Para obtener resultados óptimos es necesario realizar un paso de precipitación de las proteínas para así eliminar las interferencias que producen otros compuestos orgánicos que posean nitrógeno. Otro método químico es el de *Biuret,* que se basa en la reacción de las proteínas con una disolución de sulfato de cobre, mediante la cual se forma un compuesto coloreado que absorbe radiación a una determinada longitud de onda. Por último, se puede emplear el método *Lorry*, en el que se utiliza el reactivo de *Folin y Ciocalteu*, el cual detecta residuos de tirosina debido a su naturaleza fenólica. Para incrementar la sensibilidad del método, se le añade a dicho reactivo iones cuprosos, produciéndose entonces la unión proteína-cobre que absorbe en la región de 600-800 nm
- Métodos basados en la unión proteína-indicador; mediante esta unión se observa un cambio de color en el indicador. Los indicadores más utilizados son el naranja de metilo, el verde de bromocresol o el morado de bromocresol.
- Métodos inmunológicos; utilizan anticuerpos para precipitar la proteína blanco y la turbidez resultante se mide mediante turbidimetría.

Para realizar el proceso de separación de las proteínas, también existen numerosos métodos como el de precipitación con sales que contienen sulfitos, sulfatos y fosfatos. Las sales se van añadiendo en concentración creciente y las diferentes proteínas van precipitando escalonadamente. Posteriormente, se procede a la centrifugación o filtración.

Otro método es la electroforesis. En esta técnica tanto la carga como el tamaño molecular son parámetros a tener en cuenta para la realización de dicha separación. Muchas veces al realizar

la separación electroforética de las proteínas lo que se obtiene es un conjunto de bandas y zonas de proteína que son difíciles de identificar. En estos casos, las proteínas se pueden identificar mediante métodos inmunológicos como el de *Western blotting* **[1]**, si bien para su aplicación es imprescindible la existencia del anticuerpo correspondiente.

Por último, los métodos de separación más empleados son los cromatográficos, principalmente la cromatografía en gel. La cromatografía de intercambio iónico, con fases estacionarias como la dietilaminoetil (DEAE) o carboximetil (CM), se usa tanto para separar las distintas proteínas como para cromatografía preparativa. Otros tipos de cromatografía a emplear son la de afinidad, que permite una alta especificidad al utilizar anticuerpos, o la cromatografía en fase reversa, que usa fases estacionarias de tipo C_{18}, C_4 o la C_8 **[1, 2]**.

1.1.1.- MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNAS

Si nos referimos concretamente a la determinación de metalotioneínas, se pueden usar, como técnicas de cuantificación y medida, técnicas clásicas como las polarográficas, los ensayos inmunológicos, radioinmunoensayos (RIA, *Radioimmunoassay*), ensayos inmunosorbentes (ELISA, *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay*) **[3-6]** o ensayos basados en la unión a metales como el cadmio o el mercurio **[6]**. Sin embargo, todas estas técnicas no son muy selectivas en cuanto a diferenciar las distintas isoformas de las MTs. Además, no proporcionan información de la composición metálica y están sujetas a numerosas interferencias.

En los últimos años está muy extendido el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y de la electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*). Ambas técnicas son capaces de separar las isoformas de MTs. Sin embargo, la detección con UV es muy poco sensible y no es una técnica específica para la detección de los metales ligados a éstas. Esto hace que en la actualidad se acoplen las técnicas de separación con detectores de moléculas y elementos que posean una alta sensibilidad **[5]**. En dicho acoplamiento el mayor problema que nos podemos encontrar es la interfase entre la técnica de separación y la técnica de determinación de metales espectrométrica debido a que las condiciones de separación muchas veces no son compatibles, en términos de flujo y de composición de fase móvil, con las condiciones requeridas por el detector **[3, 4]**.

Las principales técnicas de detección de metales ligados a MTs son la espectrometría de absorción atómica (AAS), que puede ser con atomización en llama o en horno de grafito, la espectrometría de plasma acoplado por inducción-espectrometría de masas (ICP-MS), que es muy sensible y posee capacidad multielemental; la espectrometría de plasma acoplado por inducción-espectrometría de emisión atómica (ICP-AES) o la espectrometría de masas o en tándem con ionización de electrospray (ESI-MS o ESI/MS(MS), *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*). Los acoplamientos más destacados son los referidos a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con técnicas espectrométricas como AAS, ICP-AES, ICP-MS, o ESI-MS, y el acoplamiento de la CE con ICP-MS o con ESI-MS **[3-5]**. Dentro de HPLC los tipos de cromatografía más empleados son la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, *Size Exclusión Chromatography*), la cromatografía de intercambio iónico (AEC, *Anion Exchange Chromatography*), la cromatografía en fase reversa (RF, *Reverse Phase Chromatography*) **[3, 6]** y la cromatografía de afinidad **[4]**.

En cuanto a las técnicas que han sido desarrolladas para la evaluación de las MLPs presentes en los tejidos de los mejillones nos encontramos con la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de absorción atómica (HPLC-AAS, *High Performance Liquid Chromatography - Atomic Absorption Spectrometry*), la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a plasma acoplado por inducción espectrometría de masas / espectrometría de emisión óptica (HPLC-ICP-MS/OES, *High Performance Liquid Chromatography – Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry / Optical Emission Spectrometry)*, distintos ensayos de sustitución metálica o técnicas radioinmunológicas y electroquímicas. También se ha desarrollado un método espectrofotométrico sencillo, sensible y de bajo coste que permite una cuantificación precisa de las MLPs presentes en los tejidos de los organismos marinos. Este método consiste en evaluar la concentración de las MLPs en una fracción que contiene MLP parcialmente purificada, obtenida por fraccionamiento con etanol/cloroformo del tejido homogeneizado. A los extractos se les añade el reactivo de *Ellman* (DTNB, *5-5´Ditio-bis(ácido nitrobenzoico*)) y se realiza la medida a una longitud de onda de 412 nm **[7]**.

1.1.1.1.- MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Debido a la gran importancia que presenta la técnica CE en todo lo referido al análisis de proteínas, podemos citar trabajos en los que los que se utiliza ésta para la especiación de MTs; por ejemplo, el realizado por *Álvarez-Llamas et al.* **[8]** en hígado de pescado; o *Minami et al.* **[9]** en hígado fetal de ratón. Finalmente, *Beattie* **[10]** revisó la aplicación de la CE en la determinación, tanto cualitativa como cuantitativa de las MTs, haciendo hincapié en los tipos de tubos que se pueden utilizar, recubiertos o no, las condiciones electrolíticas y los métodos de preparación de la muestra. Se concluyó que las condiciones más adecuadas para un análisis cualitativo implica la utilización de capilares no recubiertos combinados con disoluciones reguladoras de tipo fosfato de pH bajo, o capilares recubiertos de poliacrilamida de pH neutro combinado con disoluciones reguladoras de tipo fosfato, también de pH neutro. Si se quiere realizar un análisis cuantitativo, lo mejor es utilizar electrolitos de borato-dodecil sulfato sódico a pH alcalino en capilares no recubiertos. En cuanto a la preparación de la muestra, ésta se puede llevar a cabo mediante una extracción en disolvente de dos pasos o mediante extracción en fase sólida.

1.1.1.2.- MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN POR TÉCNICAS POLAROGRÁFICAS

Como ya se ha indicado, es común el uso de técnicas polarográficas y voltamperométricas en la determinación de grupos disulfuro y tiolato presentes en las proteínas, péptidos y aminoácidos. Podemos citar así, el trabajo realizado por *Nieto et al.* **[11]**, en el que se aplica polarografía de pulso diferencial para la especiación de las tres isoformas de MT (MT-I, II y 0) presentes en hígado fetal humano. Además, en este trabajo se estudia el efecto producido por la adición de Cd y Zn y el cambio de pH, obteniendo información sobre las características estructurales de las MTs al distinguirse señales diferentes para las MTs de Cd y Zn. Además, se observan dos picos para el Zn atribuidos a dos complejos diferentes del Zn con las MTs, similares a los que se observan en el caso del Cd, lo que hace que se pueda afirmar que el comportamiento de estas MT del hígado fetal humano es similar a las de otros mamíferos. Estos mismos autores caracterizaron las MT de Cd y Zn presentes en riñón humano adulto mediante polarografía de pulso diferencial **[12]**. Al igual que en el estudio anterior, se investigaron las propiedades de complejación de las tres isoformas actuando sobre el equilibrio químico tras la adición de Cd y Zn,

y mediante la variación del pH. Se logró distinguir también las formas químicas de los distintos compuestos a través de la respuesta eléctrica además de comprobarse que los equilibrios entre las distintas especies de Cd y Zn son reversibles, obteniéndose una especie u otra en función del pH. *Ruiz et. a.l* **[13]** realizaron estudios similares sobre MT de Cd y Zn de hígado de conejo y riñón de caballo, obteniéndose resultados concordantes con las investigaciones antes citadas.

1.1.1.3.- MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

En cuanto a las técnicas cromatográficas, se ha empleado la cromatografía de fase reversa (RP), la cromatografía de intercambio iónico (AE, *Anion Exchange*), y la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Existen numerosos trabajos en los que se utilizan varias de estas técnicas cromatográficas en función del estudio a llevar a cabo, bien el contenido total de MTs o MLPs, o bien la distribución de las distintas isoformas. A su vez, es común el acoplamiento de las diferentes técnicas cromatográficas empleadas en el proceso de separación y en el de preparativa de las MTs con las técnicas de detección ICP-MS, (ICP-(TOF)MS), de doble cuadrupolo (ICP-(Q)MS, *Inductively Coupled Plasma - Quadrupolo Mass Spectrometry*) o de doble focalización (ICP-(DF)MS, *Inductively Coupled Plasma - (Double Focusing)Mass Spectrometry*). Así se pueden citar varios trabajos realizados por *Ferrarello et al.* **[14-17]** en los que se muestran estos tipos de acoplamiento y detección, así como las ventajas e inconvenientes de cada uno, aplicados a las MTLs de muestras de mejillón de tipo *Mytilus edulis*. Estos mismos investigadores compararon los resultados obtenidos mediante FPLC-ICP-MS, y los obtenidos con cromatografía de intercambio iónico convencional, en la separación de MTs de hígado de conejo y especiación de Cd ligado a éstas. Observaron que con el primer tipo de acoplamiento la resolución y reproducibilidad en los picos era mejor, así como el tiempo de análisis y por ello aplicaron esta técnica a muestras reales de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus edulis* **[18]**. En otros estudios, como el presentado por *Wolf et al.* **[19]**, se proponen dos tipos de separación cromatográfica de MTs presentes en hígado humano cirrótico, concretamente la cromatografía de intercambio iónico para el contenido total de MTs, y la cromatografía de exclusión por tamaños para el fraccionamiento de las MTs y posterior determinación del contenido metálico por ICP-AES. Por otra parte, estos autores concluyen que con el detector ICP-MS la cantidad de muestra necesaria es menor, además de poder detectarse más metales ligados a las MTs por el alto poder de detección que presenta ICP-MS frente ICP-AES. Otros investigadores como *Polec et al.* **[20]** combinaron la

separación cromatográfica con la detección mediante ICP-MS y ESI-MS para la determinación de MTs presentes en tejido de riñón de rata. Primero, llevaron a cabo una separación por exclusión de tamaño, y seguidamente una preconcentración y determinación por cromatografía de fase reversa-ICP-MS o ESI-MS. El paso de preconcentración es necesario si se realiza la detección con ESI-MS debido a la baja sensibilidad que presenta.

Otros acoplamientos entre las distintas técnicas cromatográficas y las técnicas espectrométricas emplean los denominados tubos de cuarzo en forma de T como interfase entre el sistema cromatográfico y el espectrométrico. Así *Tan et al.* **[21]** usaron este sistema para la determinación de MTs y MLPs en tejidos de moluscos y mamíferos, tras la separación de éstas por SEC y AEC, concluyendo que es un sistema económico que proporciona una buena sensibilidad en las medidas, siendo una alternativa a las técnicas espectrométricas de absorción y emisión convencionales.

Otros trabajos basan únicamente su aplicación en la cromatografía en fase reversa, como por ejemplo los trabajos realizados por *Chassaigne et al.* **[22-25]** en los que se utiliza fases reversa tipo Vydac C_8 acopladas a ESI-MS o ICP-MS, para la especiación de MTs en hígado de conejo. En todos estos estudios se ve que el acoplamiento entre la cromatografía líquida de alta resolución y la espectrometría de masas con ionización de electrospray (HPLC-ESI-MS) es una herramienta muy potente para resolver los problemas de polimorfismo que presentan las MTs. Estos mismos autores compararon los resultados obtenidos mediante los acoplamientos entre la electroforesis capilar y el plasma acoplado por inducción espectrometría de masas (CE-ICP-MS, C*apillary Electrophoresis - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) y HPLC (de fase reversa)-ESI-MS en la detección e identificación de MT y sus isoformas, así como en la distribución metálica en ellas. Concluyeron que tanto la HPLC como la CE son dos técnicas muy atractivas para el estudio de la distribución metálica en las diferentes isoformas y subisoformas, mientras que la detección de los metales con ICP-MS es muy sensible pero si se usa acoplado a CE requiere de una interfase diseñada a medida. En el caso de utilizar ESI-MS el inconveniente señalado fue la necesidad del empleo de una postcolumna acidificada **[26]**. En otros casos, además del acoplamiento entre cromatografía de fase reversa-ESI-MS, estos autores llevaron a cabo el acoplamiento entre la cromatografía de fase reversa y el detector de array de diodos y un detector de masas ((DAD)-ESI-MS, *Diode Array Detector - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*), comprobándose que esta última técnica es muy potente en la resolución de isoformas de MT **[27]**. Asimismo, cabe destacar aquellos estudios en los que se modifica la columna de fase reversa,

como los realizados por *Goenaga-Infante et al.* **[28, 29]**, donde una columna C_{18} se modifica con bromuro de didodecildimetilamonio. La fase móvil empleada en estos estudios contiene esta misma sustancia, dando resultados similares a los obtenidos mediante cromatografía de cambio iónico y siendo además una técnica robusta y de bajo costo.

Existen numerosas publicaciones basadas en la separación de MTs y posterior determinación del contenido metálico presente en éstas, en las que se usa cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Podemos citar por ejemplo el trabajo realizado por *Ferrarello et al.* **[30]** en el cual se emplean muestras de mejillón procedentes de tres puntos distintos de la costa española. Primeramente, se hace una separación cromatográfica en columna con Sephadex G-75 y a continuación, se determinan los metales presentes por ICP-MS. Se comprueba que la concentración de metal presente en las MLPs está relacionada con procesos de contaminación, al encontrarse niveles más elevados en muestras localizadas en zonas más contaminadas y expuestas a mayor polución. Por otro lado, *High et al.* **[31]** determinaron también los metales presentes en MTs de hígado de conejo y MLPs de muestras de mejillón, mediante diferentes técnicas como microatomización - espectrometría de absorción atómica (MA-AAS, *Microatomization - Atomic Absorption Spectrometry*), ICP-MS y ESI-MS tras la separación de estas proteínas mediante SEC. Con la técnica de ESI-MS y HPLC-ICP-MS se determinan los pesos moleculares y los perfiles metálicos de cada MT y con HPLC-ICP-MS y HPLC-MA-AAS se determinó el estado redox de los grupos cisteína tras un proceso de saturación con cadmio en presencia o ausencia de un agente reductor. Otros investigadores como *Wolf et al.* **[32]**, tras el estudio de diversas formas de extracción de las MTs, investigaron los metales unidos a este tipo de proteínas mediante ICP-MS, tras la separación de estas con SEC, concretamente con una columna de tipo Superdex 75 PC.

Cuando se emplea la cromatografía de cambio iónico, tanto si se acopla ésta a ICP-MS o ICP-AES, la fase móvil más utilizada es la disolución reguladora TRIS-HCl de pH 7,5 **[21, 33]** o 7,4 **[18, 19, 34]**, trabajando de forma habitual en modo gradiente y siendo las concentraciones más comunes de las disoluciones reguladoras 2-200 mM **[18, 34]**, 20-250 mM **[19]**, 30-400 mM **[33]** ó 10-100 mM **[21]**. Por otro lado, el flujo de elución más empleado es de 1ml/min **[18, 19, 34]** y el volumen de inyección de 50 µl **[18, 34]** ó 250 µl **[19]**. En algunas aplicaciones empleando la cromatografía de cambio iónico, se han llevado a cabo pasos de preconcentración de las MTs mediante ultrafiltración bajo N_2 tras realizar una cromatografía de filtración en gel con una columna tipo Sephadex G75 sobre el extracto citosólico de mejillón **[33]**.

1.1.2- MÉTODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Podemos definir la cromatografía como la ciencia que se encarga de separar los distintos componentes presentes en una muestra. Las separaciones se pueden realizar mediante diferentes técnicas que se basan en las características moleculares que presenten los componentes. Así, tenemos técnicas que se basan en las diferentes cargas moleculares, otras en el tamaño molecular, masa molecular, polaridad de los enlaces, potencial redox o constantes de ionización. Muchas separaciones realizadas en cromatografía utilizan campos eléctricos. Estas técnicas reciben el nombre de electroseparación o electromigración y electroforesis **[35]**.

Los principios operacionales de la cromatografía son los mismos que los de las operaciones de extracción. El proceso se puede describir de la siguiente forma: si tenemos una disolución que contiene por ejemplo dos analitos, A y B, que queremos separar, esta disolución se hace pasar a través de una columna empaquetada con un sorbente determinado. Los analitos van a fluir por la columna quedándose más o menos retenidos dependiendo de sus características y de las del sorbente, ayudados por un flujo de disolvente que se introduce en la columna, de esta forma se va produciendo la separación. Se pueden distinguir dos fases claramente diferenciadas, la fase estacionaria, que es la fase que se encuentra en el interior de la columna y una fase móvil (líquida o gas) que es la que se mueve a través de la columna.

El fluido que entra en la columna se llama eluyente y el que sale eluato. Asimismo, el paso de líquido o gas a través de la columna se denomina elución **[36]**. La fase estacionaria recibe además otros nombres como por ejemplo soporte sólido, sorbente, fase estática o material empaquetado **[35]**.

La cromatografía es una técnica muy versátil, ya que hace posible la separación de moléculas que difieren mínimamente en sus propiedades físicas o químicas. La distribución del soluto en las dos fases es resultado del balance de fuerzas entre las moléculas de soluto y las moléculas de cada fase **[37]**.

Hay diferentes clasificaciones de esta técnica. Así, tenemos las clasificaciones basadas en las diferentes interacciones entre el soluto y la fase estacionaria, las basadas en el tipo de fase móvil empleada y las basadas en el tipo de soporte donde se coloca la fase estacionaria.

Si nos referimos a la clasificación según los mecanismos de interacción entre el soluto y la fase estacionaria tendremos:

- Cromatografía de adsorción; está formada por una fase estacionaria que es un sólido y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto es adsorbido en la superficie de las partículas sólidas.
- Cromatografía de partición; la fase estacionaria líquida forma una fina película en la superficie de un soporte sólido.
- Cromatografía de cambio iónico; los aniones, tanto los que poseen carga positiva como los de carga negativa, se unen de forma covalente a la fase estacionaria sólida, que suele ser una resina. Los iones de carga opuesta son atraídos por la fase estacionaria por fuerzas de tipo electrostáticas. La fase móvil es habitualmente un líquido.
- Cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de filtración en gel; aquí la separación de las moléculas se produce atendiendo al tamaño de los analitos, que quedarán retenidos o no en la fase estacionaria dependiendo de éste.
- Cromatografía de afinidad; es la más selectiva de todas, se basa en las interacciones del analito con moléculas específicas unidas covalentemente a la fase estacionaria (ejemplo, el uso de un anticuerpo para separar un proteína determinada). **[36]**

Según el tipo de fase móvil, tenemos la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos y la cromatografía de fluidos supercríticos, según se emplee un gas, un líquido o un fluido supercrítico como fase móvil **[35, 38]**. Dentro de la cromatografía de líquidos tenemos la cromatografía líquido-líquido, cuando tanto la fase móvil como la estacionaria son líquidos, o la cromatografía líquido-sólido si la fase estacionaria es un sólido. En la de gases cabe destacar la cromatografía gas-líquido y la gas-sólido, según sea líquida o sólida la fase estacionaria **[39]**. Teniendo en cuenta el soporte de fase móvil nos encontramos con la cromatografía en columna, cuando la fase estacionaria se coloca en un tubo o columna, y la cromatografía plana, donde la fase estacionaria está sobre una lámina plana o en los poros del papel **[38]**.

Los solutos eluidos de la columna cromatográfica son observados mediante los detectores, los cuales pueden ser de distintos tipos. Los cromatogramas son las gráficas que muestran la respuesta del detector que es función del tiempo de elución **[36]**. Estas gráficas sirven

para realizar análisis tanto de índole cuantitativa como cualitativa. La posición de los picos a lo largo del eje x, que normalmente representa al tiempo, sirve para identificar los distintos componentes de la muestra y las áreas bajo los picos nos proporciona información sobre la cantidad de cada especie **[38]**. En estos cromatogramas podemos distinguir el tiempo de retención de cada analito, que es el tiempo necesario para que el analito alcance el detector desde que la muestra compleja es inyectada en la columna. Otro parámetro que hay que tener en cuenta es el volumen de retención, que es el volumen requerido para eluir el analito en cuestión, y el tiempo muerto que es el tiempo que tarda la fase móvil en recorrer la columna. De esta forma, se puede definir el tiempo de retención ajustado como el tiempo de retención de cada compuesto menos el tiempo de retención muerto, como queda reflejado en la **ecuación 3.1**:

$$t'_r = t_r - t_m \quad \textbf{(Ec. 3.1)}$$

Siendo t_r el tiempo de retención del compuesto en cuestión y t_m el tiempo muerto.

Asimismo, si separamos dos compuestos, la relación entre sus tiempos de retención es lo que se denomina retención relativa α, como se puede observar en la **ecuación 3.2**:

$$\alpha = \frac{t'_{r_2}}{t'r_1} \quad \textbf{(Ec. 3.2)}$$

Cuanto mayor sea la retención relativa mayor será la separación **[36]**. Este factor es dependiente de la naturaleza de la fase estacionaria, de la fase móvil y de la temperatura de operación **[39]**.

Otro factor a tener en cuenta es el factor de capacidad, que es propio para cada señal cromatográfica y viene definido por:

$$k' = \frac{t'_r - t'_m}{t'_m} \quad \textbf{(Ec. 3.3)}$$

El factor de capacidad será mayor cuanto mayor sea la retención del analito en la columna **[36]**. Este factor nos proporciona información acerca de los equilibrios de distribución de los analitos en la columna debidos a las propiedades termodinámicas de ésta y de la temperatura **[39]**.

Por otro lado existe una relación entre el factor de capacidad y la retención relativa que viene dada por la **ecuación 3.4**:

$$\alpha = \frac{t'_{r_2}}{t'_{r_1}} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \textbf{(Ec. 3.4)}$$

Los factores que contribuyen en la obtención de una buena separación son la diferencia en los tiempos de elución de los compuestos Así, a mayor diferencia, mayor separación. La anchura de los picos también contribuye a una buena separación; a mayor anchura, menor separación. La eficiencia de separación se puede medir a través del parámetro resolución que viene dada por la **ecuación 3.5**:

$$resolución = \frac{\Delta t_r}{w_{av}} = \frac{\Delta V_r}{w_{av}} \quad \textbf{(Ec. 3.5)}$$

Donde Δt_r o Δt_v es la separación entre picos, en unidades de volumen o de tiempo y w_{av} es la media de la anchura de dos picos en sus unidades correspondientes.

Otro factor que nos indica la eficiencia de la separación es la difusión, que se define como la velocidad de un soluto al moverse desde una zona de mayor concentración a otra menos concentrada. Así, el ensanchamiento de la banda por la difusión queda reflejado en la **ecuación 3.6**:

$$c = \frac{m}{\sqrt{4\pi Dt}} e - x^2 /(4Dt) \quad \textbf{(Ec. 3.6)}$$

Donde c es la concentración, t es el tiempo, x es la distancia a lo largo de la columna y D es el coeficiente de difusión.

Por último, la altura de plato y el número de platos teóricos son medidas que nos indican la eficiencia de la columna. El nombre de plato proviene de la teoría de la destilación en la cual la separación se realizaba en discretas etapas llamadas platos. En muchas destilaciones de alta resolución las columnas eran construidas mediante unidades discretas denominadas platos en los cuales se producía el equilibrio entre el líquido y el vapor.

La altura de plato es la constante de proporcionalidad entre la varianza de la banda (σ^2) y la distancia que recorre. Cuanto más pequeño es el plato más estrecha es la banda y esta altura viene definida como:

$$H = \frac{\sigma^2}{x} \quad \textbf{(Ec. 3.7)}$$

Donde σ es la desviación estándar de una gaussiana (los solutos al moverse por una columna cromatográfica tienden a difundirse dando lugar a una gaussiana) y x es la distancia recorrida a través de la columna.

En cuanto al número de platos teóricos (N) de una columna de longitud L, éstos son iguales a:

$$N = \frac{16tr^2}{w^2} = \frac{tr^2}{\sigma^2} \quad \textbf{(Ec. 3.8) [36]}$$

Este parámetro refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso por la columna **[39]**.

La ecuación de *Van Deemter* relaciona las características de la columna y la velocidad de flujo con la altura de plato teórico según:

$$H \approx A + \frac{B}{ux} + Cux \quad \textbf{(Ec.3.9)}$$

Donde u_x es la velocidad de flujo lineal y A, B y C son constantes propias de la columna y de la fase estacionaria, de forma que si cambiamos la fase estacionaria o la columna estos valores cambian.

Los principales factores que afectan a la resolución quedan recogidos en la **ecuación 3.10**:

$$resolución = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_2}{1 + k_{av}}\right) \quad \textbf{(Ec. 3.10)}$$

Aquí se ve que la resolución es proporcional a la raíz cuadrada del número teórico de platos y que ésta se incrementa al aumentar tanto la retención relativa (α) como el factor de capacidad k'_2.

El ensanchamiento de los picos se debe fundamentalmente a la varianza atribuida a la inyección y a la detección, o a la existencia de espacios muertos. También va a influir la difusión longitudinal producida, como ya se indicó, por la difusión de las moléculas desde regiones de altas concentraciones a regiones de menor concentración. El término B/u_x de la ecuación de *Van Deemter* aumenta al aumentar la difusión longitudinal y con ello el número de platos teóricos, lo que conlleva a un ensanchamiento de banda. **[36]**

Es importante distinguir entre la resolución y la eficiencia en la separación referida al número y altura de los platos teóricos. La resolución está determinada por los cambios en la fase estacionaria, en la fase móvil, temperatura o longitud de la fase estacionaria a través de la cual ocurre la separación. En cuanto a la eficiencia de separación ésta está relacionada con la difusión de la banda y viene determinada por los factores referidos a la construcción y empaquetamiento de la columna y a la velocidad de la fase móvil **[35]**. Así, cuanto menores son los flujos de fase móvil menor es el número de platos teóricos y mayor es la eficiencia. También a menor viscosidad de ésta, mejores resultados se obtienen. En cuanto al empaquetamiento de la columna cabe decir que a menor tamaño de partícula mejor será la eficiencia y que a su vez, a temperaturas altas la eficiencia también se ve mejorada **[38]**.

La precisión y los límites de detección de los métodos cromatográficos dependen en gran medida del detector empleado. La elección de éste viene condicionada por las características físicas y químicas de los analitos presentes, de sus concentraciones, del propio tamaño de muestra así como de la dilución que van a sufrir **[35]**.

1.1.2.1- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tiene una importante aplicación cuando los compuestos a determinar no son lo suficientemente volátiles como para ser determinados mediante cromatografía de gases. El sistema de HPLC consiste básicamente en un sistema de distribución del disolvente, una válvula de inyección de la muestra, una columna de alta presión, un detector, y un ordenador para el control del sistema y para registrar los resultados.

La eficiencia en la separación se ve influenciada por el empaquetamiento de la columna, así se observan mejores resultados cuando el tamaño de partícula es más pequeño. Esto se debe a que ofrecen un flujo más uniforme a lo largo de la columna, reduciendo así el número de caminos posibles a recorrer dentro de ella. Una segunda razón es que la distancia a través de la cual los solutos deben difundirse en la fase móvil entre las partículas es del orden del tamaño de partícula.

Las columnas que se suelen utilizar son de acero, plástico o vidrio, de longitudes comprendidas entre 5 y 30 cm y de diámetros internos de 1 a 5 mm. Son caras y se degradan con facilidad y por ello muchas veces se emplean las precolumnas, que no son más que columnas fabricadas con la misma fase estacionaria, que se colocan antes de la columna para evitar así que compuestos no deseados o partículas de mayor tamaño lleguen a la columna de análisis. El calentamiento de la columna disminuye la viscosidad de la fase móvil haciendo que se reduzca la presión requerida. Los incrementos de temperatura hacen que decrezca el tiempo de retención y que se mejore la resolución. Asimismo, hace que se degrade la fase estacionaria y que por lo tanto la vida de la columna sea menor. **[36]**. El control de la temperatura no es necesario si trabajamos en cromatografía líquido-sólida, a menos que se opere a temperaturas muy elevadas, sin embargo si es necesario dicho control en cromatografía líquido-líquido, cromatografía de exclusión o de cambio iónico. Además, muchos detectores son sensibles a los cambios de temperatura haciendo que sea necesaria la colocación de un sistema de refrigeración entre la columna y el detector **[37]**. Las variaciones en la temperatura pueden causar cambios en el tiempo de retención, afectando a los análisis cualitativos y a la precisión de los análisis cuantitativos. Las temperaturas elevadas presentan ventajas en cuanto que hacen decrecer la viscosidad de la fase móvil, incrementan la transferencia de masa y hacen decrecer la solubilidad de la muestra, haciendo que la resolución sea mayor y el análisis más rápido **[39]**.

Las partículas utilizadas en el empaquetamiento en HPLC pueden ser de tres tipos:

1. Partículas microporosas; son partículas de tamaño comprendido entre 5-10 μm, sólo las pequeñas partículas de soluto son accesibles a estos poros.
2. Partículas macroporosas; son partículas con diámetros superiores a 60 μm que posen altas porosidades que hacen que sean accesibles tanto para moléculas grandes como para pequeñas.
3. Partículas peliculares; de diámetro entre 35-45 μm, tienen un núcleo rodeado por una película de fase estacionaria.

Para minimizar los problemas debidos a la difusión y el tiempo requerido para movilizar el compuesto a lo largo de la columna, el empaquetamiento de la columna debe estar finamente dividido y ser esféricamente regular, además la fase móvil debe estar formando una fina película **[37]**.

El soporte de fase estacionaria más comúnmente utilizado es la sílica, la cual presenta una alta pureza, una naturaleza esférica en sus partículas, buena permeabilidad al disolvente y alta área superficial. Se disuelve en agua a un pH superior a 8 y por ello no se puede usar por encima de este pH, aunque hay sílices de calidades mayores que son estables a pHs superiores a 9. Cuando se cromatografian compuestos básicos los soportes más utilizados son los de tipo polimérico como el poliestireno.

El proceso de elución consiste en el desplazamiento de las moléculas de soluto situadas en la fase estacionaria por las moléculas de disolvente. Hay dos modos de realizar la elución, modo isocrático y modo en gradiente. En el primero se emplea un único disolvente o una mezcla de disolventes constante, mientras que en el segundo se emplean varios disolventes en forma de gradiente. Los disolventes deben ser de gran pureza para evitar la degradación de la columna. Además, muchas veces es necesario filtrar el disolvente y purgarlo para eliminar el aire disuelto ya que las burbujas de aire afectan a la columna, detector y bomba **[36]**. El sistema para desgasificar el disolvente consta de una bomba de vacío, un sistema de destilación, y un mecanismo de calentamiento y agitación. También se puede llevar a cabo el proceso de desgasificación por purga con un gas inerte, normalmente helio, o bien exponiendo la fase móvil a un campo de ultrasonidos **[38]**.

Para introducir el disolvente en el sistema se utilizan bombas que proporcionen un flujo estable y reproducible, ya que las fluctuaciones en el flujo producen ruidos no deseados en el detector **[36]**. Las características que deben presentar las bombas son una buena capacidad para generar presiones por encima de 6000 psi, pulsos libres, y velocidades de flujo que varíen entre 0,1 y 10 ml/min. Además, deben ser resistentes a la corrosión **[38]**. En HPLC es preferible el uso de disolventes de baja viscosidad, ya que los disolventes con viscosidades elevadas hacen que disminuya el flujo de la fase móvil **[39]**.

La introducción de la muestra se realiza mediante la válvula de inyección que posee bucles de volumen fijo intercambiables. La válvula muestra dos posiciones, una de carga, en esta posición se carga el bucle con la muestra a presión atmosférica, y la posición de inyección donde la muestra pasa a la columna a alta presión.

El modo de separación de los componentes de una muestra compleja va a depender del peso molecular y de si son solubles en agua o en disolventes orgánicos.

En cuanto a la detección, el detector debe ser sensible a bajas concentraciones, proporcionar respuestas lineales y ser poco sensible a los cambios de temperatura y de composición del disolvente. Los principales detectores a tener en cuenta en cromatografía líquida son los detectores ultravioleta-visible (UV-VIS), los detectores de fluorescencia, los detectores de índice de refracción, y los detectores electroquímicos. El detector de UV-VIS es el más empleado debido a que la mayoría de los solutos absorben en esta región, y se suele trabajar a una longitud de onda de 254 nm. **[36]**. En muchas ocasiones se utilizan técnicas de derivatización para aumentar el grado de detectabilidad en absorción UV-VIS, fluorescencia o electroquímica **[39]**. En el caso de especiación organometálica, se pueden emplear distintas técnicas espectrométricas atómicas como detectores.

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se distinguen por las diversas formas de interacción entre la fase estacionaria y los analitos. Hay cuatro tipos básicos de interacciones, de fase normal, fase reversa, de cambio iónico y de filtración en gel. Cuando la fase estacionaria está formada por grupos quirales que proporcionan lugares específicos de unión, la cromatografía se denomina de afinidad **[35]**.

1.1.2.1.1- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE CAMBIO IÓNICO

En la cromatografía de cambio iónico la retención se basa en la atracción entre los iones de soluto y los sitios de enlace cargados de la fase estacionaria **[36]**. En este tipo de cromatografía la separación se lleva acabo en una columna empaquetada con grupos funcionales cargados unidos a una matriz polimérica. El grupo funcional está permanentemente unido a grupos iónicos asociados a iones que contrarrestan las cargas opuestas **[39]**.

Las resinas son partículas amorfas de material orgánico. Los intercambiadores iónicos se pueden clasificar en ácidos o bases fuertes o débiles. Cuanto más rígidas y menos porosas sean las resinas mejor será el entrecruzamiento **[36]**. A mayor entrecruzamiento mayor será la selectividad, menor la porosidad y la solubilidad de la resina. En general se usan materiales de porosidad media para especies iónicas de peso molecular bajo y materiales de porosidad elevada para especies iónicas de alto peso molecular **[37]**.

El empaquetamiento de las columnas depende del tipo de compuesto que se quiere separar. Así, las empaquetadas con grupos cargados negativamente son utilizadas para separar especies catiónicas, mientras que si el empaquetamiento es catiónico, éste separará aniones. El grupo funcional más empleado para el cambio de tipo catiónico es el sulfonato, que es un intercambiador fuertemente ácido, y las aminas cuaternarias para el intercambio de tipo aniónico. Las propiedades de intercambio dependen del pH de la fase móvil, lo cual hace que el número de grupos funcionales disponibles sea mayor o menor **[39]**. Así, tenemos que para intercambiadores de tipo catiónico de ácido débil el rango de funcionalidad referente al pH se encuentra entre 5-10 y si es de ácido fuerte entre 1-14. Para un intercambiador de tipo iónico de base fuerte será entre 0-12 y de base débil entre 0-9.

La cromatografía de cambio iónico se aplica principalmente en procesos de purificación, preconcentración y los relacionados con separaciones analíticas **[37]**.

OBJETIVO

OBJETIVO

La existencia de diferentes isorformas en las MLPs presentes en los moluscos, concretamente en los mejillones, hace que uno de los objetivos perseguidos en todo nuestro trabajo de investigación haya sido el fraccionamiento, especiación de las isoformas MLP-I y MLP-II y la determinación de la concentración metálica asociada a cada una de ellas.

Para ello se desarrollarán métodos de determinación de Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr y Zn ligados a ambas isoformas. Los métodos se basan en la cromatografía de cambio iónico-HPLC-ICP-OES tanto *on line* como *off line*. Con el método HPLC-ICP-OES *on line* se estudiará la distribución metálica en cada una de las isoformas, mientras que con el método HPLC-ICP-OES *off line* se cuantificará la concentración metálica asociada a cada una de las isoformas.

Una vez que los métodos se desarrollen, éstos se aplicarán a muestras de mejillón de batea de la Ría de Arousa.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de E. Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de cloruro de arsénico (III) de 1000 µg/ml de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Disolución patrón de nitrato de níquel de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de vanadio de 997±5 mg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de estaño (II) de 1000±5 µg/ml de BDH (Poole, Reino Unido).
* Disolución patrón de cloruro de cobalto de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de silicio de 1005±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de dióxido de selenio de 1001±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de bario de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de nitrato de estroncio de 999±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de aluminio de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de hierro (III) de 1000 µg/ml (Pekin Elmer).
* Disolución patrón de nitrato de manganeso de 1000±0,002 µg/ml de Panreac (Barcelona, España).
* Patrones de MT-I y MT-II de hígado de conejo de Sigma-Aldrich (Stemheim, Switzerland).
* Tris-(hidroxietil)-aminometano de Riedel-de Haën (Steinheim, Suiza).
* 2-Mercaptoetanol 99% (Fluka).
* Fenilmetilsulfonil fluoruro 99% (Fluka).
* Cloruro sódico (Merck).
* Ácido clrohídrico 37% de J. T Baker (Deventer, Holanda).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Argón, Airliquide N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).
* Nitrógeno, Airliquide N-50 (Jaime Rey).
* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp.(Massachusetts, Estados Unidos).

3.2- MATERIAL

* Especrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción modelo Optima 3300 DV Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Muestreador AS 91 (Perkin Elmer).
* Bomba Peristáltica (Perkin Elmer).
* Bomba de HPLC modelo 515 de Waters (Milford, MA, Estados Unidos).
* Inyector, válvula de inyección Rheodyne 7725i de Rheodyne (Cotati, CA, Estados Unidos).
* Jeringa Hamilton de 100 µl modelo 81030 de Hamilton Company (Reno, Nevada, Estados Unidos).
* Columna de vidrio de intercambio iónico DEAE-5PW, 8X75 mm (Waters).
* Detector de UV-VIS modelo 486 (Waters).
* Sofware Millennium (Waters).
* Centrífuga Centromix modelo 540 de Selecta (Barcelona, España).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen modelo 2K15 de Sigma (Osterode, Alemania).
* Peachímetro, Thermo Orion, modelo 720 de Orion Research (Cambridge, Reino Unido).
* Electrodo de vidrio-calomelanos Thermo Orion 8102BN (Orion).
* Balanza Sartorios BL 610 (Selecta).
* Balanza Sartorius BP 121 S (Selecta).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* Filtros de acetato de celulosa no estéril de diámetro de poro 0,20 µm de Albet (Barcelona, España).
* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.
* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

3.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón, a continuación se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10% durante 48. A continuación, se saca y se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q. Por último, el material se seca en estufa y una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena para su uso.

*3.4- OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN*

Para la optimización de la separación cromatográfica de las diferentes isoformas de MLP presentes en los mejillones se partió de varios extractos obtenidos mediante un método de percusión (Stomacher) descrito en el Capítulo II. Cada extracto se diluyó a 25 ml utilizando como disolvente una disolución reguladora TRIS-HCl (2,0/2,0 mM) de pH 7,4 y se filtró (0,20 µm) antes de ser inyectado en el cromatógrafo. En orden a estudiar la separación cromatográfica y comprobar los tiempos de retención para las dos isoformas MLP-I y MLP-II, se emplearon disoluciones patrón de MT-I y MT-II comerciales (hígado de conejo). Dichas disoluciones patrón se prepararon en disolución reguladora TRIS-HCl (2,0/2,0 mM) de pH 7,4.

*3.4.1- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE FASE MÓVIL EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II***

Como ya se ha expuesto, el modo de trabajo más comúnmente empleado en la separación cromatográfica de las diferentes isoformas de las MTs, es en gradiente. En nuestro caso nos hemos propuesto optimizar una separación sencilla en modo isocrático para obtener un método rápido de separación de las dos isoformas MLP-I y MLP-II. Dada la moderada sensibilidad del detector empleado (ICP-OES) el uso de la elución en gradiente y la consecuente separación de las distintas sub-isoformas no revelarían concentraciones apreciables de metales para cada sub-isoforma y por el contrario alargaría enormemente el tiempo de separación, comúnmente entre 30 y 60 minutos **[16-18]**. La fase móvil investigada es una disolución reguladora TRIS-HCl de pH 7,4, cuya concentración se varía en el intervalo 2,0-200,0 mM. El primer paso, pues, fue optimizar la concentración de fase móvil. Para ello, las condiciones de medida en el HPLC se fijaron en los valores que se muestran en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1: Condiciones de medida en HPLC para la optimización de la composición de fase móvil en la separación de las isoformas MLP-I y MLP-II en extractos citosólicos de mejillón

Tipo de Columna	Fase móvil/mM	Flujo ml/min	Volumen de inyección/µl	Modo de elución	Adquisición de los datos	λ/nm
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 2, 5, 10, 20, 50, 75, 200mM pH 7,4	0,8	200	Isocrático	Detección en UV-VIS	254

Los resultados obtenidos para los extractos citosólicos de mejillón, para cada concentración de TRIS-HCl estudiado se pueden observar en las **figuras 3.1-3.3**.

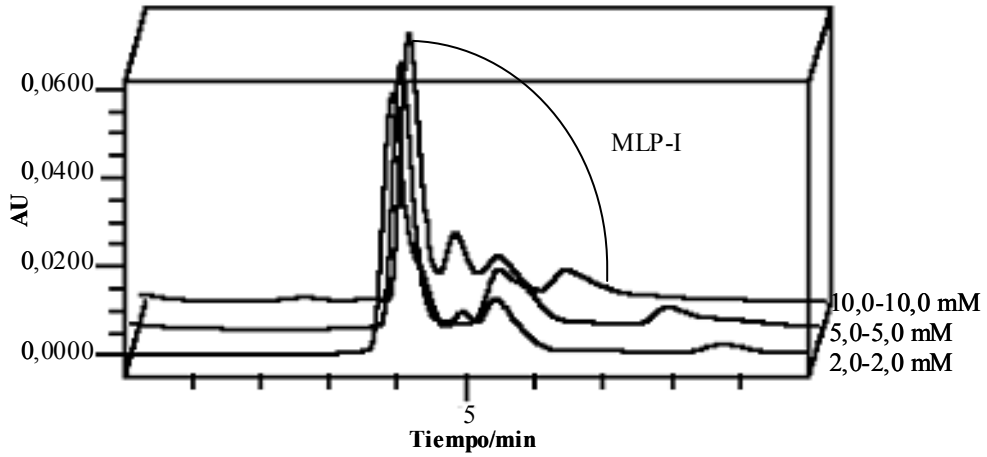


Figura 3.1: Superposición de los cromatogramas obtenidos para MLP-I y MLP-II mediante cromatografía de intercambio iónico, para concentraciones de TRIS-HCl de 2,0-2,0, 5,0-5,0 y 10,0-10,0 mM

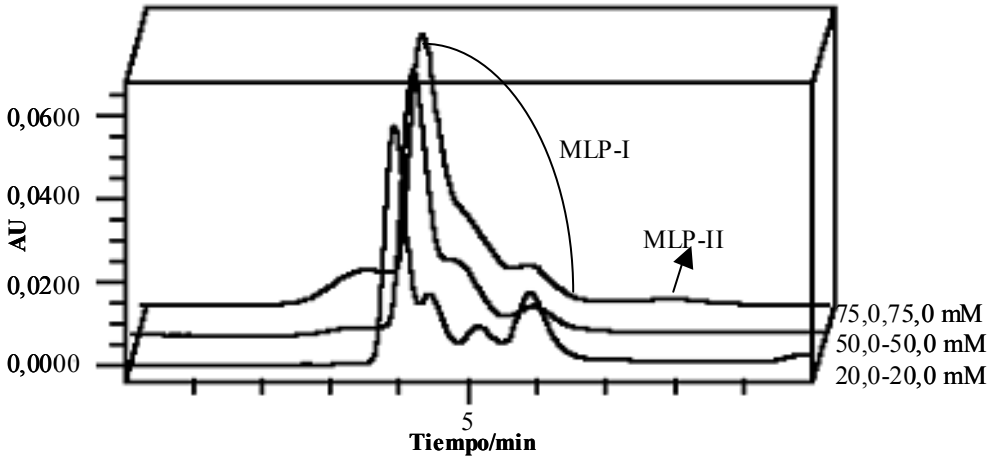


Figura 3.2: Superposición de los cromatogramas obtenidos para MLP-I y MLP-II mediante cromatografía de intercambio iónico, para concentraciones de TRIS-HCl de 20,0-20,0, 50,0-50,0 y 75,0-75,0 mM

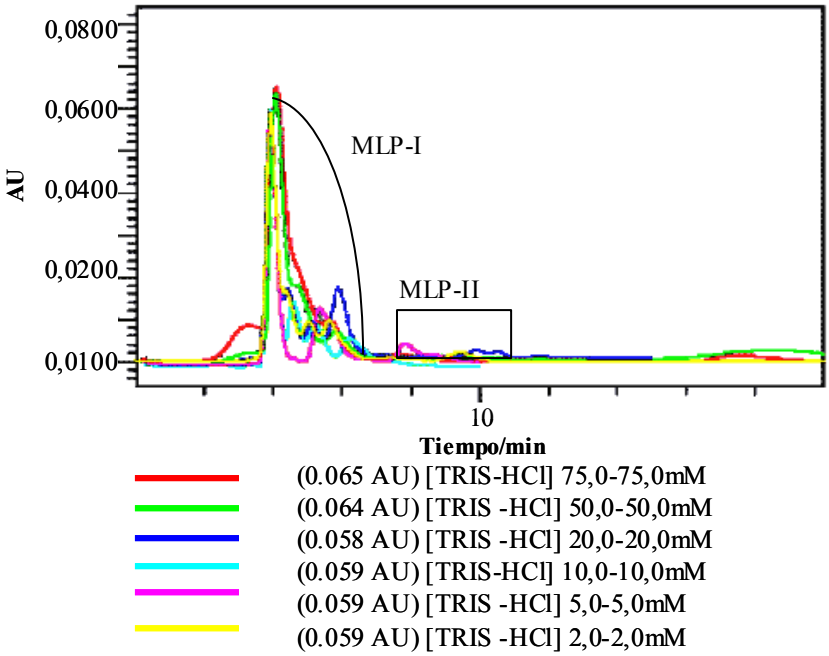


Figura 3.3: Superposición de todos los cromatogramas obtenidos para cada una de las concentraciones de TRIS-HCl probadas

Como puede verse (**figuras 3.1-3.3**), cuando se emplean bajas concentraciones de fase móvil se observan cuatro sub-isoformas para la isoforma MLP-I. Sin embargo, la isoforma MLP-II no eluye dentro de los diez primeros minutos a bajas concentraciones de fase móvil (**figura 3.1** y **3.2**). Estos resultados coinciden con los obtenidos por *Ferrarello et al.* **[18]** quienes han separado diferentes subisoformas de la isoforma MT-I en hígado de conejo trabajando en gradiente y empleando bajas concentraciones de fase móvil para separar las sub-isoformas de la MT-I.

Cuando se emplea una concentración de 75,0 mM, se observan tres sub-isoformas de la isoforma MLP-I y una pequeña señal correspondiente a la isoforma MLP-II (a 7,40 min de tiempo de retención). Sin embargo, a altas concentraciones de fase móvil se observa un solapamiento de las señales correspondientes a las isoformas MLP-I y MLP-II (**figura 3.3**) lo cual indica una coelución de las dos isoformas a altos valores de fuerza iónica.

De manera similar, cuando se inyectan los patrones de MTs (MT-I y MT-II) se observa una buena separación cromatográfica a un valor de concentración de fase móvil de 75,0 mM y un solapamiento a valores de 200,0 mM (**figuras 3.4** y **3.5**).

De esta manera, se llega a una situación de compromiso entre una pobre resolución de las dos isoformas a altos valores de concentración de fase móvil y una resolución parcial de las sub-isoformas de la isoforma MLP-I a bajas concentraciones de fase móvil. Así, se seleccionó como concentración más adecuada 75,0 mM.

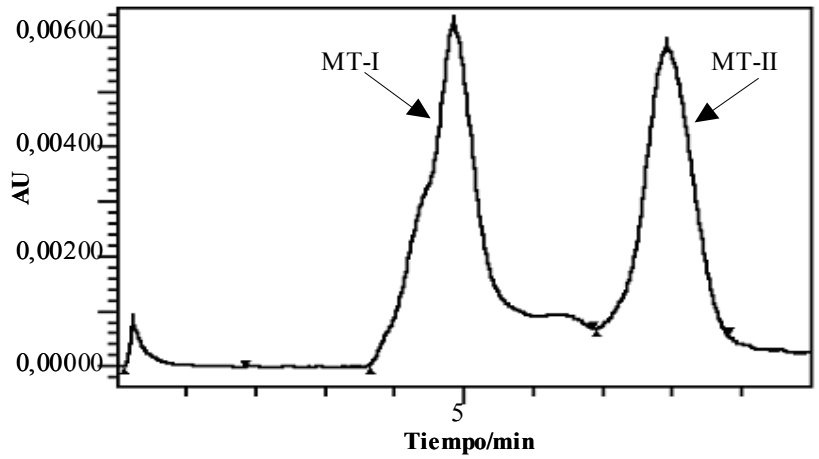


Figura 3.4: Cromatograma obtenido para la mezcla de patrones de 10 µg/ml de MT-I y MT-II de hígado de conejo con fase móvil TRIS-HCl 75,0-75,0 mM

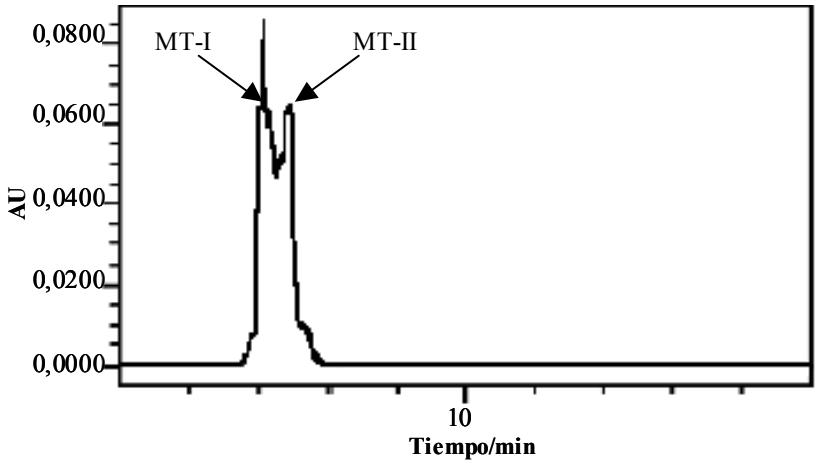


Figura 3.5: Cromatograma obtenido para la mezcla de patrones de 10 µg/ml de MT-I y MT-II de hígado de conejo con fase móvil TRIS-HCl 200,0-200,0 mM

*3.4.2- OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE FASE MÓVIL EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II***

Una vez optimizada la concentración de fase móvil TRIS-HCl, se procedió a optimizar el flujo de fase móvil. Para ello se inyectó un extracto citosólico de mejillón, esta vez diluido 5 veces, y se registraron los cromatogramas a distintos flujos. Las condiciones de medida en HPLC son las mostradas en la **tabla 3.2**.

Tabla 3.2: Condiciones de medida en HPLC para la optimización del flujo de fase móvil en la separación de las isoformas MLP-I y MLP-II

Tipo de Columna	Fase móvil/mM	Flujo ml/min	Volumen de inyección/µl	Modo de elución	Adquisición de los datos	λ/nm
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 75,0-75,0mM pH 7,4	0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2	200	Isocrático	Detección en UV-VIS	254

Los cromatogramas obtenidos para cada uno de los flujos estudiados se pueden ver en la **figura 3.6**.

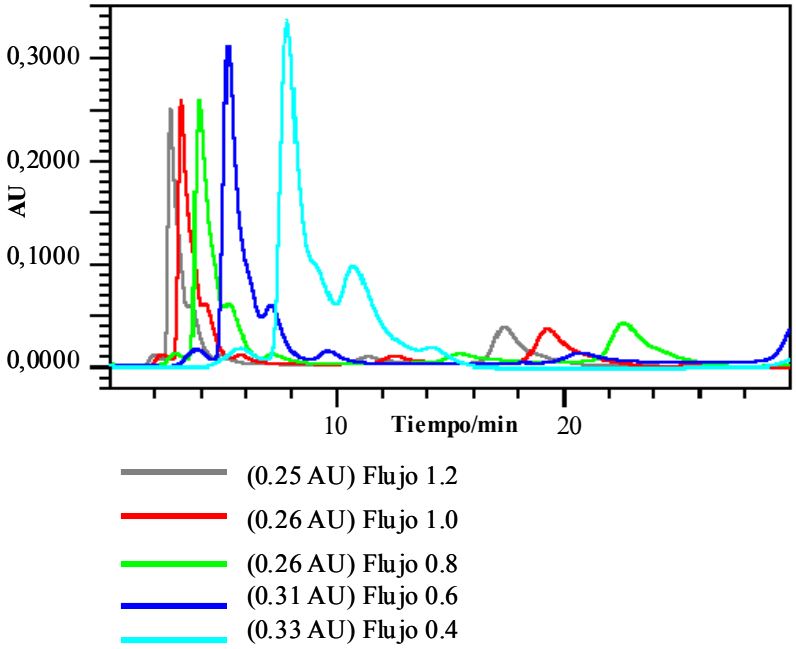


Figura 3.6: Superposición de los cromatogramas obtenidos para cada flujo de fase móvil estudiado en la separación cromatográfica de las isoformas MLP-I y MLP-II

Se decide tomar como flujo óptimo 0,8 ml/min ya que se logra una buena resolución entre picos. A flujos mayores se tarda más tiempo en producir la elución y la resolución no es mucho mejor, mientras que a flujos bajos ésta es peor.

Una vez optimizados el flujo y concentración de fase móvil, se realizaron una serie de pruebas para comprobar si lo que se estaba determinando eran exactamente las isoformas MLP-I y MLP-II. Para ello, en las condiciones óptimas de medida en HPLC (**tabla 3.3**), se inyectó un extracto citosólico (dilución 1:5) y su cromatograma se comparó con el obtenido para una mezcla de patrones de MT-I y MT-II de 10 µg/ml, para observar así los posibles desplazamientos de las bandas cromatográficas.

Tabla 3.3: Condiciones óptimas de medida en HPLC para la separación de las isorformas MLP-I y MLP-II

Tipo de Columna	Fase móvil/mM	Flujo ml/min	Volumen de inyección/µl	Modo de elución	Adquisición de los datos	λ/nm
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 75,0-75,0mM pH 7,4	0,8	200	Isocrático	Detección en UV-VIS	254

Como puede verse en la **figura 3.7**, los tiempos de retención para ambas isoformas (MLP-I y MLP-II) procedentes del extracto citosólico de mejillón no coinciden con los tiempos de retención de los patrones MT-I y MT-II. Esto se debe principalmente a que dichos patrones se corresponden a MTs de hígado de conejo, siendo distintas a las MLPs del mejillón.

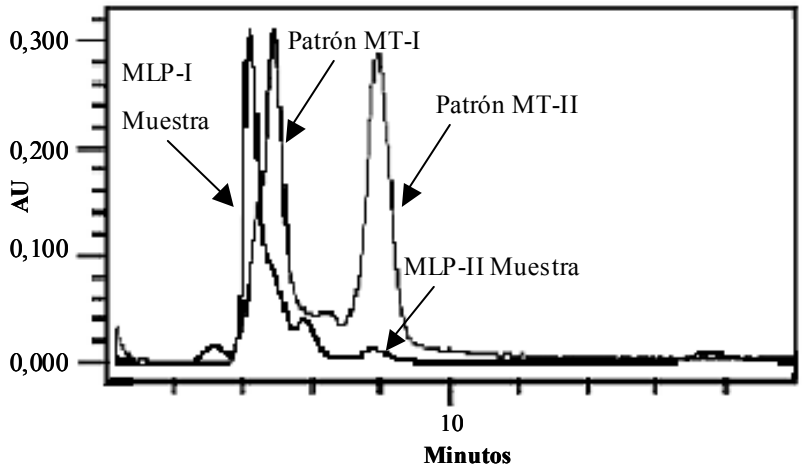


Figura 3.7: Cromatogramas obtenidos para la muestra y la mezcla de patrones de MT-I y MT-II de 10 µg/ml

Asimismo, se adicionó al mismo extracto citosólico de mejillón, disolución patrón de MT-II de 5 µg/ml, para comprobar que la señal de menor intensidad que se registra en torno a 7 min es la correspondiente a la isoforma MLP-II. En la **figura 3.8** queda comprobado que la señal en torno a 7 min se corresponde con la elución de la isoforma MLP-II. Por otra parte, la cantidad de MLP-II presente en el extracto citosólico de mejillón es pequeña. El tiempo de retención de la isoforma MLP-I es 4,01min y el de la isoforma MLP-II es 7,40 min.

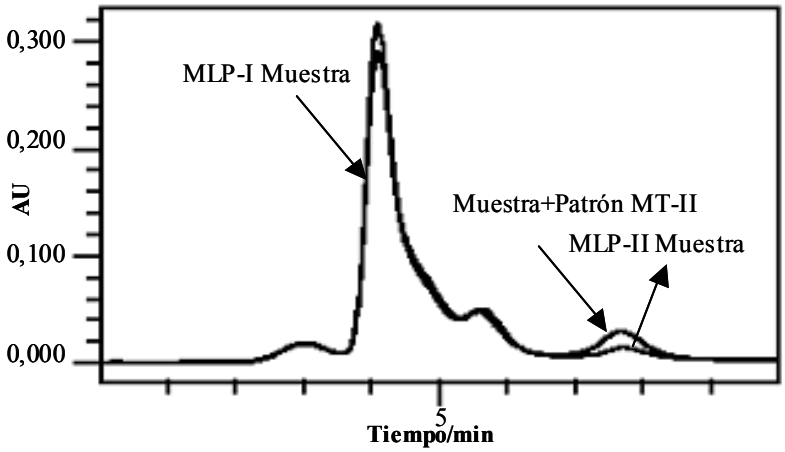


Figura 3.8: Cromatogramas para la muestra dopada con patrón de MT-II de 5 µg/g y muestra sin dopar

3.4.3- CÁLCULO DE LA REPRODUCIBILDAD EN EL TIEMPO DE RETENCIÓN

Para el cálculo de la reproducibilidad en el tiempo de retención se inyectó 10 veces un extracto citosólico de mejillón (dilución 1:5) y se registró la señal. Las condiciones de medida son las mostradas en la **tabla 3.3**.

Los resultados obtenidos para cada inyección se recogen en la **tabla 3.4**, mientras que la **figura 3.9** muestra la superposición de los 10 cromatogramas obtenidos.

Tabla 3.4: Resultados obtenidos para la MLP-I y MLP-II en el estudio de la reproducibilidad en el tiempo de retención

Medida Nº	**t_r/min MLP-I**	**t_r/min MLP-II**
1	4,02	7,43
2	4,03	7,45
3	4,05	7,47
4	3,98	7,32
5	4,00	7,37
6	4,00	7,37
7	3,98	7,38
8	3,98	7,37
9	4,00	7,40
10	4,02	7,42
Media	**4,01**	**7,40**
sd	**0,02**	**0,05**
CV	**0,6**	**0,6**

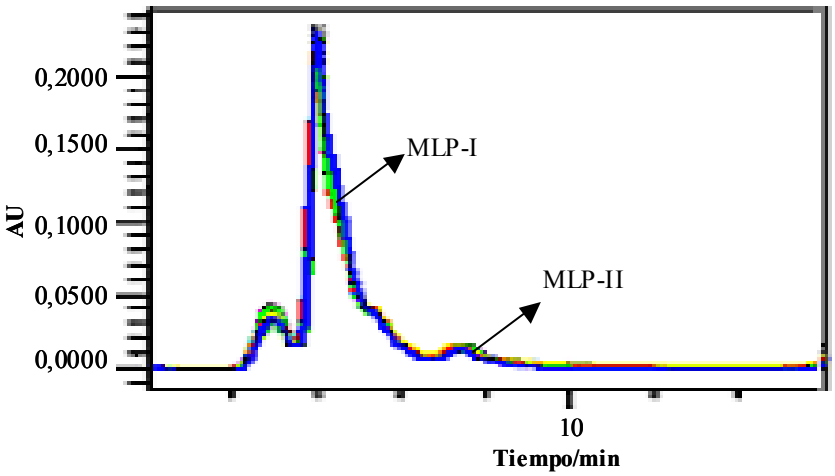


Figura 3.9: Superposición de los 10 cromatogramas obtenidos en el estudio de la reproducibilidad en el tiempo de retención de las dos isoformas

Como se puede comprobar, los resultados obtenidos para la reproducibilidad en el tiempo de retención para las dos isoformas son buenos ya que tanto el CV como la sd se encuentran dentro de unos valores aceptables.

3.4.4- CÁLCULO DE LA RESOLUCIÓN ENTRE PICOS

Para el cálculo de la resolución entre picos se partió de la fórmula dada en la **ecuación 3.5**, tomando los tiempos de retención y los anchos de banda correspondientes a las 10 inyecciones realizadas para el estudio de la reproducibilidad en el tiempo de retención. Los resultados se recogen en la **tabla 3.5**.

$$resolución = \frac{\Delta tr}{wav} = \frac{\Delta Vr}{wav} \quad \textbf{(Ec. 3.5)}$$

Tabla 3.5: Resolución entre picos de las dos isoformas de MLP

Medida Nº	**Ancho de Pico** w_1+w_2	**Tiempo de retención** $t_{m2}-t_{m1}$	**Resolución**
1	6,54	3,42	1,04
2	6,52	3,42	1,04
3	6,49	3,42	1,05
4	6,25	3,33	1,07
5	6,78	3,37	0,99
6	6,49	3,37	1,04
7	6,55	3,40	1,04
8	6,31	3,38	1,07
9	6,34	3,40	1,07
10	6,47	3,40	1,05
		Media	**1,05**
		sd	**0,02**

Como ya se ha explicado, la resolución mide el grado de separación entre dos bandas cromatográficas. Si el valor de este parámetro es del orden de 0,5, esto indica que las sustancias a separar presentan un solapamiento del 16 % (pobre separación). Si por el contrario el valor de la resolución está en torno a 1,0, el solapamiento es inferior al 2,3 %, bajando hasta un 0,1 % cuando la resolución alcanza un valor cercano a 1,5 **[35, 37, 39]**. En nuestro caso, se ha obtenido un valor de 1,05±0,02, lo que indica que el solapamiento es menor del 2,3% y que ambas isoformas están bien resueltas.

*3.5- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN METÁLICA ASOCIADA A LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** POR HPLC-ICP-OES on line*

Para el estudio de la distribución metálica en cada una de las isoformas, se acopló el sistema de HPLC al detector multielemental ICP-OES. Se inyectaron por duplicado extractos citosólicos de mejillón (directamente, sin dilución previa) y se registraron los cromatogramas a distintas longitudes de onda correspondientes a distintos metales. Las condiciones de medida en el sistema HPLC-ICP-OES son las que se muestran en la **tabla 3.6**, mientras que los elementos y las líneas de emisión seleccionados para el estudio se recogen en la **tabla 3.7**.

Tabla 3.6: Condiciones de medida en el sistema HPLC-ICP-OES

Condiciones HPLC	
Volumen de inyección/µl	200
Flujo/(ml/min)	0,8
Composición de la Fase Móvil	TRIS-HCl 75,0-75,0mM, pH 7,4
Tipo de Columna	Protein Pak DEAE-5PW 8x75mm
Modo de Elución	Isocrático
Detección ICP-OES	
Potencia de Radiofrecuencias/W	1300
Flujos de los Gases/(l/min)	
Gas de Nebulización	0,85
Gas Auxiliar	1,0
Gas Plasmógeno	15,0
Tipo de Nebulizador	GemCone (Cámara Ciclónica)
Flujo de la muestra/(ml min^{-1})	0,8, 1,5[a]
Tiempo de estabilización/s	90, 45[a]
Número de réplicas	120, 4[a]
Disposición de medida	Axial

[a]= Condiciones de medida en el sistema *off line*

Tabla 3.7: Elementos y líneas de emisión empleadas en el estudio *on line*. Las líneas de emisión en negrita se corresponden a las líneas de emisión seleccionadas

Elemento	Líneas de emisión/nm	Elemento	Líneas de emisión/nm
Al	**308,215**	***Fe***	**238,204**
	394,403		239,572
	396,162	***Mn***	**257,610**
Ba	233,527		259,374
	455,422		260,571
Cd	214,437	***S***	180,669
	226,508	***Sr***	**460,740**
	228,805	***Zn***	**202,534**
Cu	224,700		206,200
	324,756		213,859

En las **figuras 3.10** y **3.11** se pueden ver los cromatogramas superpuestos de varios de los elementos estudiados.

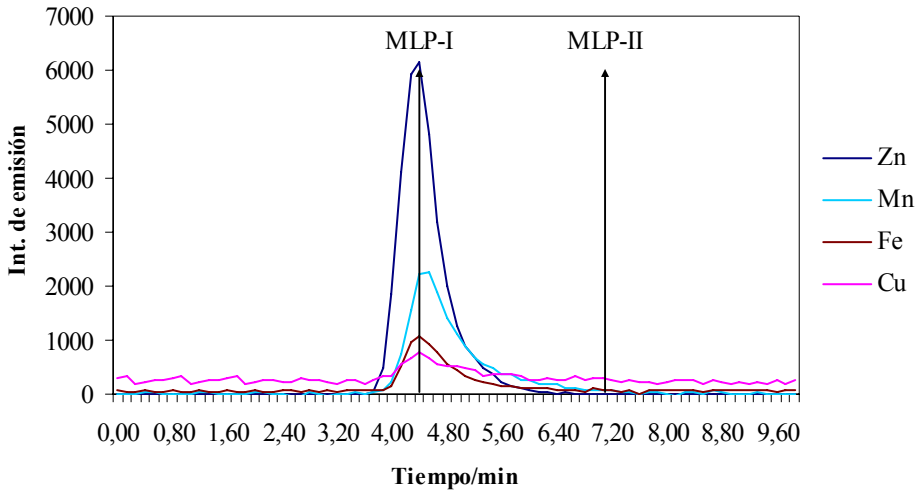


Figura 3.10: Cromatogramas obtenidos para el Zn, Mn, Fe y Cu ligados a las MLPs de mejillón mediante HPLC-ICP-OES *on line*

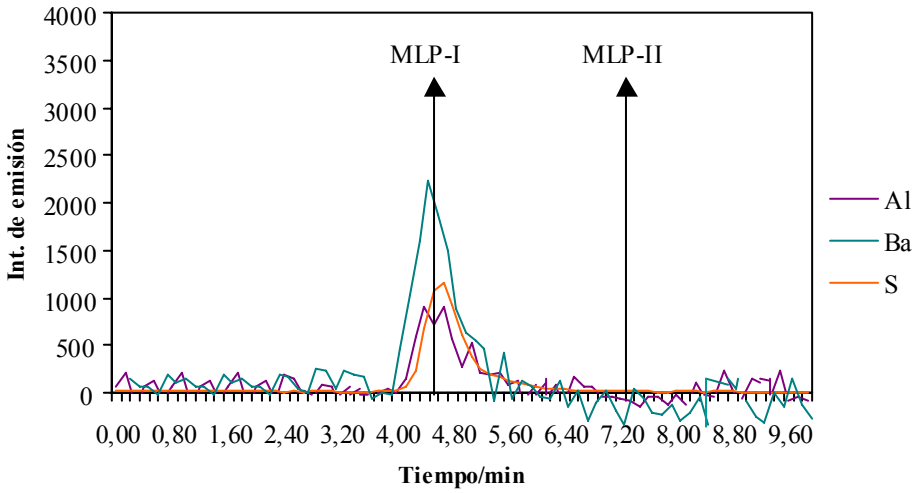


Figura 3.11: Cromatogramas obtenidos para el Al, Ba y el S ligados a las MLPs de mejillón mediante HPLC-ICP-OES *on line*

Observando las **figuras 3.10** y **3.11** vemos que los elementos para los cuales se registra señal de emisión apreciable son el Cu, Zn, Ba, Al, Mn, S y el Fe, siendo los dos primeros junto con el Cd los elementos que más comúnmente aparecen ligados a este tipo de metaloproteínas. Cabe destacar la ausencia de metal ligado a la isoforma MLP-II. Esto es debido a la baja concentración de esta isoforma en los tejidos procedentes de invertebrados. Además, hay que tener en cuenta que las muestras de mejillón empleadas en el presente estudio son muestras de acuicultura, por lo que han sido cultivadas en aguas limpias.

Asimismo, tampoco se ha detectado presencia de Cd ligado a las MLPs. Esto es debido a que la técnica de detección empleada no es lo suficientemente sensible como para detectar dicho elemento a los niveles en los que está presente. Para poder determinar el Cd asociado a las MPLs sería necesario emplear un detector más sensible, como por ejemplo, un ICP-MS.

Para comprobar la bondad del método de separación optimizado en relación a metales habitualmente ligados a metaloproteínas, se registró la señal de emisión atómica correspondiente al Cd en la separación de las dos isoformas patrón de MTs (MT-I y MY-II) extraídas de hígado de conejo. En las **figuras 3.12** y **3.13** se recogen los cromatogramas correspondientes a mezcla de dichos patrones a concentraciones de 100µg/ml cada uno.

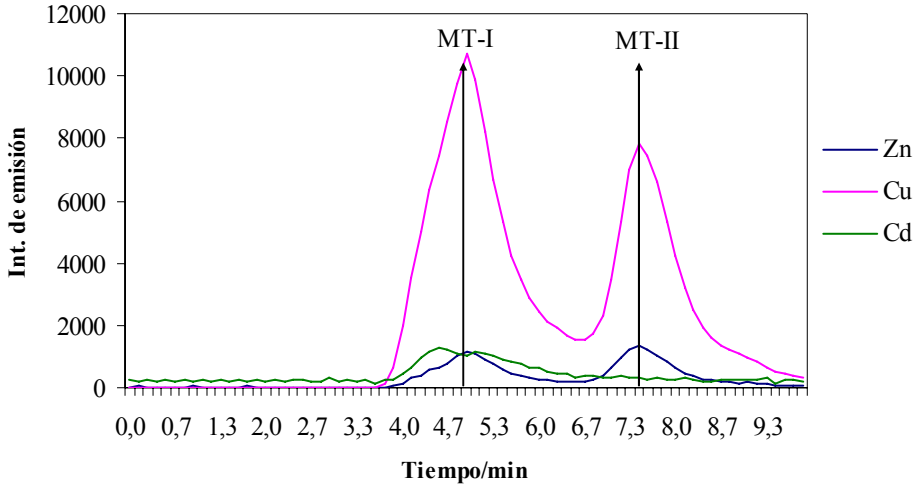


Figura 3.12: Cromatogramas obtenidos para el Zn, Cu y Cd, ligados a las MTs de hígado de conejo (100µg/ml cada una) por HPCL-ICP-OES *on line*

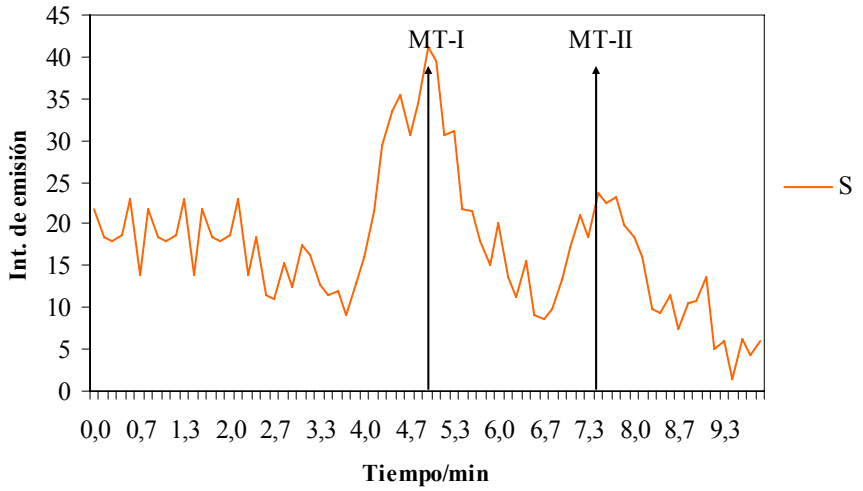


Figura 3.13: Cromatograma obtenido para el S ligado a las MTs de hígado de conejo (100µg/ml cada una) por HPLC-ICP-OES *on line*

Como puede verse en dichos cromatogramas, se distingue perfectamente el Cd ligado a ambas isoformas, así como el Cu y el Zn ligado a la isoforma MT-II. Todo ello implica una buena capacidad de separación del método, siendo el sistema HPLC-ICP-OES desarrollado adecuado para determinar los metales habitualmente ligados a MTs en tejidos de mamíferos.

3.5.1- CÁLCULO DE LA REPETIBILIDAD EN EL TIEMPO DE RETENCIÓN Y EN LA ALTURA DE PICO PARA LOS METALES ASOCIADOS A MLPs DETERMINADOS MEDIANTE HPLC-ICP-OES on line

La repetibilidad en el tiempo de retención y altura de pico para cada metal ligado a la MLP-I se determinó por HPLC-ICP-OES *on line*. Dicho estudio se llevó a cabo haciendo la media de seis inyecciones de un mismo extracto citosólico de mejillón. Los resultados, expresados como media, desviación estándar y coeficiente de variación, se muestran en la **tabla 3.8**.

Tabla 3.8: Repetibilidad en el tiempo de retención y en la altura de pico para seis inyecciones en HPLC-ICP-OES *on line* de un extracto citosólico de mejillón

	Tiempo de Retención MLP-I por HPLC-UV-Visible: 4,01±0,02 min			
	Tiempo de Retención/min		**Altura de Pico/unidades de altura**	
	Media±sd	**CV/%**	**Media±sd**	**CV/%**
Ba	4,05±0,13	3	1352±68	5
Cu	4,03±0,18	4	779±51	6
Fe	3,98±0,11	3	627±12	2
Mn	4,08±0,08	2	1674±78	5
S	4,54±0,15	3	2194±53	2
Zn	3,98±0,11	3	4048±98	2

*3.6- ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN METÁLICA ASOCIADAS A LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** POR HPLC-ICP-OES off line*

Se llevó a cabo un estudio empleando HPLC-ICP-OES *off line* (separación de ambas isoformas y detección posterior por ICP-OES) para obtener información cuantitativa de la concentración de metales asociados a cada isoforma, principalmente a la isoforma MLP-I. Esto es así, dado que no existen estándares metal-MT disponibles comercialmente. Para ello, se recogieron las fracciones correspondientes a las isoformas MLP-I y MLP-II, seleccionando intervalos de tiempo de 2,48 a 4,48 min (volumen recogido de 1,6 ml) para la isoforma MLP-I (tiempo de retención de 4,01±0,02 min) y 6,30 a 8,30 min (volumen recogido de 1,6 ml) para la isoforma MLP-II (tiempo de retención de 7,40±0,05 min). Las fracciones recogidas se midieron directamente en el ICP-OES en las condiciones expuestas en la **tabla 3.6**.

3.6.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

El efecto matriz y la linealidad se estudiaron mediante la realización de curvas, calibrado acuoso, calibrado en fase móvil (disolución TRIS-HCl 75,0-75,0 mM, pH 7,4) y adición estándar. Las concentraciones de los patrones en cada una de las disoluciones empleadas para construir las tres rectas se muestran en la **tabla 3.9**, mientras que los elementos y las líneas de emisión seleccionados se listan en la **tabla 3.10**. La recta de adición se construyó adicionando a cada una de las disoluciones, un volumen de 4 ml correspondiente a un pool de las fracciones de MLP obtenida tras recoger el volumen eluido en un intervalo de tiempo 1,5-9 min.

Tabla 3.9: Concentraciones de patrón multielemental para cada disolución

Patrón Nº	[ ] Patrón/(µg/ml)	Elementos
1	0	Ba, Sr
	0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
2	0,025	Ba, Sr
	1,25	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
3	0,05	Ba, Sr
	2,5	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
4	0,1	Ba, Sr
	5,0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn

Tabla 3.10: Elementos y líneas de emisión estudiadas. Las líneas de emisión en negrita se corresponden a las líneas de emisión seleccionadas

Elemento	Líneas de emisión/nm	Elemento	Líneas de emisión/nm
Ba	**455,422**	***Mn***	259,374
Cu	**324,756**		260,571
Fe	**238,204**	***Sr***	**460,740**
	239,574	***Zn***	**202,534**
Mn	**257,610**	-	

En las **figuras 3.14-3.16** podemos ver las rectas para algunos de los elementos como el Cu, Fe o el Zn.

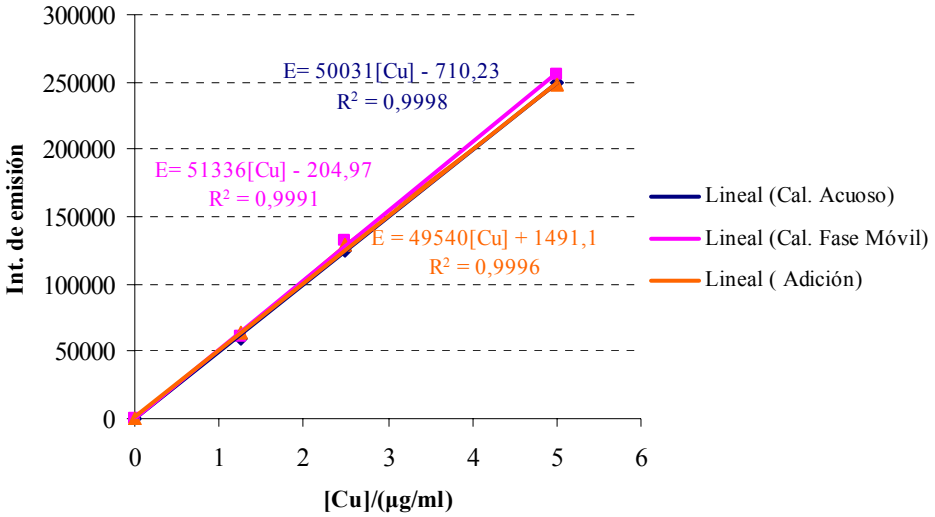


Figura 3.14: Estudio de la linealidad y efecto matriz para la determinación del Cu ligado a las MLPs en extractos citosólicos de mejillón por HPLC-ICP-OES *off line*

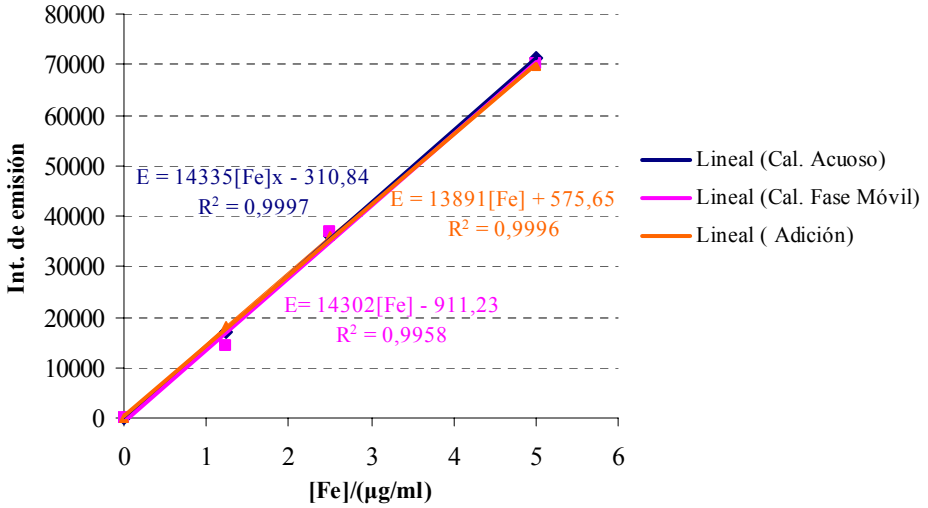


Figura 3.15: Estudio de la linealidad y efecto matriz para la determinación del Fe ligado a las MLPs en extractos citosólicos de mejillón por HPLC-ICP-OES *off line*

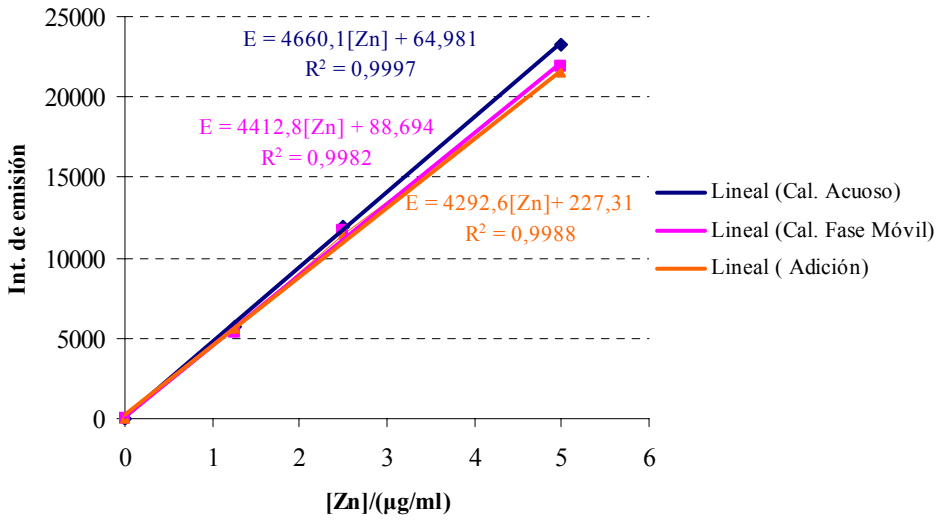


Figura 3.16: Estudio de la linealidad y efecto matriz para la determinación del Zn ligado a las MLPs en extractos citosólicos de mejillón por HPLC-ICP-OES *off line*

Tras la aplicación de los tests ANOVA y *Cochran* al 95% de confianza, se comprobó que no existen diferencias significativa entre las pendientes de las rectas de calibrado, acuoso y en fase móvil, y la pendiente de la recta de adición. Además se comprobó la linealidad en el rango de concentraciones ensayado a través del valor del coeficiente de regresión.

3.6.2- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

3.6.2.1- CÁLCULO DEL LOD Y LOQ DEL MÉTODO

La definición del LOD y el LOQ es la expuesta en el Capítulo I y resumida en las ecuaciones que siguen (**ecuaciones 3.11** y **3.12**)

$$LOD = 3\frac{\sigma blanco}{m} \quad \textbf{(Ec.311)} \qquad\qquad LOQ = 10\frac{\sigma blanco}{m} \quad \textbf{(Ec. 3.12)}$$

En este caso σ_{blanco} es la desviación estándar correspondiente a la realización de 11 medidas sobre el blanco, fase móvil TRIS-HCl 75,0-75,0 mM, y *m* es la pendiente de la recta de calibrado acuoso. Los LODs y LOQs para los diferentes elementos determinados mediante HPLC-

ICP-OES *off line* en el extracto citosólico de mejillón, referidos a peso húmedo de mejillón se recogen en la **tabla 3.11**.

Tabla 3.11: LODs y LOQs determinados para los diferentes elementos ligados a las MLPs de mejillón determinados por HPC-ICP-OES *off line*

Elemento	LOD/(ng/g)	LOQ/(ng/g)
Al	81	270
Ba	6	20
Cu	10	33
Fe	13	43
Mn	30	100
Sr	9	30
Zn	123	410

3.6.2.2- CÁLCULO DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Para el cálculo de la reproducibilidad total del método se prepararon cuatro extractos citosólicos de mejillón partiendo del mismo pool. Cada extracto se inyectó por duplicado y se cromatografió en las condiciones optimizadas, recogiendo las fracciones de MLP-I y MLP-II. Dichas fracciones se analizaron por ICP-OES, para obtener la concentración metálica en cada una de las isoformas presentes en los 4 extractos citosólicos. Los resultados de porcentaje de variación (CV) así como las concentraciones de metales para la MLP-I, se muestran en la **tabla 3.12**.

Tabla 3.12: Precisión y concentración para los distintos elementos determinados mediante HPLC-ICP-OES *off line*

Elemento	CV/%	[ ]/(µg/g)
Al	7	1,54
Ba	13	0,37
Cu	11	0,15
Fe	12	0,40
Mn	15	0,12
Sr	6	6,4
Zn	16	0,16

Los resultados obtenidos para la reproducibilidad total del método son satisfactorios (bajos valores para el CV) si tenemos en cuenta el proceso laborioso que se lleva a cabo para realizar las determinaciones. En todo el proceso, el paso que produce una mayor incertidumbre se corresponde con la obtención del extracto citosólico.

3.6.2.3- EXACTITUD DEL MÉTODO

Al no existir material de referencia certificado que exprese la concentración de metal ligado a MLPs (o MTs), el método se validó mediante la recuperación analítica. La obtención de la recuperación analítica implicaría el empleo de estándares de MLP de mejillón, los cuales no están disponibles ya que sólo existen los estándares de MT-I y MT-II, de hígado de conejo, con valores indicativos para Cd, Cu y Zn presentes en estas proteínas. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo un estudio de la recuperación analítica empleando las propias fracciones de MLPs aisladas de muestras de mejillón como "patrones *ad hoc*". Para ello, un pool de extractos citosólicos de mejillón se cromatografió varias veces y se recogieron las fracciones correspondientes a la MLP-I (entre 2,48 y 4,48 min) y MLP-II (entre 6,30 y 8,30min). Las fracciones de MLP-I se juntan formando un pool que se utilizará como "estándar" de MLP-I, haciéndose lo mismo con las fracciones correspondientes de MLP-II. Ambos pools se analizaron por triplicado en ICP-OES para determinar el contenido de metales ligados a cada fracción. A continuación, se preparon nueve extractos citosólicos a partir de la misma muestra de mejillón mediante el procedimiento de Stomacher descrito en los capítulos IIy IV. Tres de esos extractos citosólicos se prepararon de la forma optimizada, mientras que otros tres se fortificaron con 2 ml del patrón *ad hoc* de MLP-I y 2 ml del patrón *ad hoc* de MLP-II y otros tres extractos se fortificaron con 3 ml del patrón *ad hoc* de MLP-I y 3 ml del patrón *ad hoc* de MLP-II. Los volúmenes correspondientes de patrón *ad hoc* se añadieron a la muestra de mejillón fresco antes del proceso de preparación del extracto citosólico. Cada uno de los extractos obtenidos se cromatografió por duplicado, recogiendo las fracciones de MLP-I y MLP-II en los intervalos de tiempo ya descritos y midiendo cada una por ICP-OES para determinar la concentración de metales presente.

Realizadas las correspondientes medidas, la recuperación analítica se calculó teniendo en cuenta la **ecuación 3.13**.

$$\textit{Recuperación Analítica(\%)} = [\ ]_{medida} / [\ ]_{añadida} \times 100 \quad \textbf{(Ec. 3.13)}$$

Donde $[\ ]_{medida}$ es la concentración de metal ligado a la MLP-I determinada en el HPLC-ICP-OES *off line* y $[\ ]_{añadida}$ es la concentración de metal ligada al patrón *ad hoc* MLP-I. No se considera la isoforma MLP-II debido a las bajas concentraciones que presenta, menores que los LODs. Tras la aplicación de la fórmula se obtienen los resultados de recuperación analítica listados en la **tabla 3.13**.

Tabla 3.13: Recuperación analítica para el método HPLC-ICP-OES *off line*

	Metal ligado a la MLP-I (mg l^{-1a})	***Metal ligado a la MLP-I añadido (mg l^{-1})***		***Metal ligado a la MLP-I medida (mg l^{-1})***		***Recuperación Analítica/(%)***	
		2,0 ml[b]	**3,0 ml[b]**	**2,0 ml[b]**	**3,0 ml[b]**	**2,0 ml**	**3,0 ml**
Al	0,134	0,011	0,016	0,009	0,012	82	75
Ba	0,0092	-[c]	0,0011	-[c]	0,0008	-[c]	76
Cu	0,053	0,004	0,006	0,003	0,004	75	60
Fe	0,393	0,031	0,047	0,034	0,037	108	79
Mn	0,063	0,005	0,008	0,005	0,007	100	96
Sr	0,172	0,014	0,021	0,015	0,018	110	86
Zn	0,566	0,045	0,068	0,029	0,045	64	66

[a] Concentración de metal ligado a la MLP-I. [b]Concentración de metal ligado a MLP-I en la disolución patrón *ad hoc* de MLP-I. [c]No determinado

Como se puede observar los resultados son mayores del 60% para todos los elementos, siendo para Fe, Mn y Sr del 100% o próximos al 100%, lo que implica una buena exactitud para el método HPLC-ICP-OES *off line*. Las bajas recuperaciones para el Cu y Zn se atribuyen a la complejidad de todo el proceso y a la ruptura de los enlaces Cu-MLP y Zn-MLP que se pueden producir durante todo el experimento. Algunos autores como *Wolf et al.* **[19, 32]** han descrito la ruptura de los enlaces Zn-MT y Cu-MT con la temperatura. Esto hace pensar que es posible que en el paso de calentamiento a 60° C para producir la precipitación de las proteínas de estructura terciaria, se degraden los enlaces entre la MLP-I y los metales Cu y Zn.

*3.6.3- DETERMINACIÓN DE METALES ASOCIADOS A LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** EN MEJILLONES PROCEDENTES DE LA RÍA DE AROUSA POR HPLC-ICP-OES off line*

El método HPLC-ICP-OES *off line* desarrollado se aplicó a 5 muestras de mejillón de batea *Mytilus galloprovincialis* procedentes de cinco puntos diferentes de la Ría de Arousa. Cada muestra estaba compuesta por aproximadamente 30 especimenes de diferente tamaño (entre 3 y 7 cm) que conformaron una muestra compuesta. De cada una de estas muestras se prepararon dos extractos citosólicos que a su vez se sometieron al proceso HPLC-ICP-OES *off line* por duplicado bajo las condiciones optimizadas. En la **tabla 3.14** podemos ver los resultados de concentración de metales ligados a cada una de las isoformas MLP-I y MLP-II presentes en cada una de las cinco muestras.

Tabla 3.14: Niveles de concentración de metal ligado a la MLP-I y MLP-II presentes en las cinco muestras

Elemento	Muestra Nº	Concentraciones en peso húmedo/(µg/g)	
		Isoforma MLP-I	Isoforma MLP-II
Al	1	<LOD(<0,08)	<LOD(0,270)
	2	0,70±0,08	0,42±0,05
	3	1,21±0,11	0,81±0,09
	4	0,85±0,07	0,59±0,07
	5	1,47±0,15	0,72±0,06
Ba	1	1,75±0,13	0,99±0,09
	2	1,65±0,14	1,01±0,08
	3	0,025±0,002	0,88±0,07
	4	0,029±0,001	<LOD(0,02)
	5	0,056±0,002	<LOD(0,02)
Cu	1	0,20±0,02	0,19±0,04
	2	0,12±0,02	0,043±0,008
	3	0,11±0,03	0,070±0,006
	4	0,14±0,02	0,037±0,005
	5	0,11±0,03	<LOD(0,033)
Fe	1	0,3±0,06	0,34±0,05
	2	0,45±0,08	<LOD(0,043)
	3	0,50±0,06	<LOD(0,043)
	4	0,61±0,05	<LOD(0,043)
	5	0,43±0,06	<LOD(0,043)

Tabla 3.14 ***(Continuación)*****:** Niveles de concentración de metal ligado a la MLP-I y MLP-II presentes en las cinco muestras

Elemento	Muestra Nº	Concentraciones en peso húmedo/(µg/g)	
		Isoforma MLP-I	**Isoforma MLP-II**
Mn	1	0,21±0,04	<LOD(0,100)
	2	0,15±0,03	<LOD(0,100)
	3	0,067±0,003	<LOD(0,100)
	4	0,17±0,03	<LOD(0,100)
	5	0,086±0,005	<LOD(0,100)
Sr	1	4,26±0,23	0,27±0,05
	2	4,60±0,21	0,38±0,06
	3	4,14±0,18	0,46±0,07
	4	5,29±0,29	0,40±0,06
	5	4,43±0,17	0,33±0,07
Zn	1	0,21±0,03	<LOD(0,041)
	2	0,58±0,08	<LOD(0,041)
	3	1,33±0,10	0,63±0,08
	4	0,68±0,07	<LOD(0,041)
	5	0,91±0,08	0,56±0,07

Como puede verse, los elementos se encuentran principalmente ligados a la fracción MLP-I, siendo las concentraciones encontradas en la isoforma MLP-II para la mayoría de los metales inferiores al LOD.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se ha optimizado un método de separación cromatográfico mediante HPLC de intercambio iónico en modo isocrático, para separar las dos isoformas más abundantes en los extractos citosólicos de mejillón. El método optimizado implicó la utilización de una disolución reguladora TRIS-HCl 75mM / 75mM de pH 7,4 como fase móvil, a un flujo de 0,8 ml/min. Bajo estas condiciones, es posible la resolución de las dos isoformas, MLP-I y MLP-II, en un periodo de tiempo de 10 min. Cabe destacar que bajo estas condiciones, al menos tres subisoformas de la isoforma MLP-I se observan en algunas de las muestras.

Por otro lado, se investigaron los niveles de concentración de metales (Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr y Zn) asociados a cada isoforma mediante la optimización el empleo de un procedimiento HPLC-ICP-OES *off line*. En este caso los resultados tanto de LOD, LOQ, precisión y exactitud, fueron aceptables, aunque para la determinación de metales como el Cd se hace necesario la utilización de otras técnicas de detección más potentes, como las que implican Espectrometría de Masas. Aún así, podemos decir que tanto el acoplamiento *on line* como *off line* HPLC-ICP-OES, es una técnica factible que permite tanto el estudio de la distribución como la cuantificación de metales asociados a las isoformas MLP-I y MLP-II en extractos citosólicos de mejillón.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] D. J. Holme, H. Peck, *"Analytical Biochemistry"*. 3era edición 1998 Ed. Prentice Hall. Harlow, Inglaterra.

[2] M. B. De la Calle Guntiñas, G. Bordin, A. R. Rodríguez, *"Identification, characterization and determination of metal-biding proteins by liquid chromatography. A review"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 374, 369-378.

[3] R. Łobiński, H. Chassaigne, J. Szpunar, *"Analysis for metallothioneins using couled techniques"*. Talanta, 1998 46, 271-289.

[4] J. Szpunar, R. Łobinski, *"Species-Selective analysis for metal biomacromolecular coplexes using hyphenated techniques"*. Pure and Applied Chemistry, 1999, 71, 899-918.

[5] A. Prage, D. Schaumloffel, *"Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metalothionein isoforms"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 373, 441-453.

[6] M. Nordberg, *"Metallothioneins: historical review of knowledge"*. Talanta, 1998, 46, 243-254.

[7] A. Viarengo, B. Burlango, F. Dondero, A. Marro, R. Fabbri, *"Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes"*. Biomarkers, 1999, 4, 455-466.

[8] G. Álvarez Llamas, M. R, Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, *"Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 460-466.

[9] T. Minami, C. Yoshita, M. Tanaka, K. Kubo,, N. Okabe, Y. Okazaki, *"Separation of metallotionein isoforms of mouse liver cytosol by capillary zone electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 347-354.

[10] J. H. Beattie, *"Strategies for the qualitative and quantitative analysis of matallothionein isoforms by capillary electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 255-270.

[11] O. Nieto, G. Hellemans, G. Bordin, M. De Ley, A. R. Rodríguez, *"Characterization of human foetal liver Zn-metalothioneins using differential pulse polarography"*. Talanta, 1998, 45, 315-324.

[12] O. Nieto, G. Hellemans, G. Bordin, M. De Ley, A. R. Rodríguez, *"Characterisation of human adult kidney Cd, Zn-metallothioneins by differential pulse polarography"*. Biolectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 46, 45-54.

[13] C. Ruiz, A. R. Rodríguez, *"Study of the additions of cadmium and zinc to the cadmium, zinc metallothioneins using differential pulse polarography Influence of the pH"*. Analytica Chimica Acta, 1996, 325, 43-51.

[14] C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, *"Multielement trace-element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP-MS"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 373, 412-421.

[15] C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco, A. Sanz Medel, *"Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel Myttilus edulis by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration"*. Spectrochimica Acta Part B, 2002, 57, 439-449.

[16] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, M. M. Bayón, A. Sanz Medel, *"Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallotionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time of fligh mass spectrometric detection"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1558-1563.

[17] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, J. Carrrasco, A. Sanz Medel, *"Speciation of metallotionein-like proteins of the mussel mytilus edulis at basal levels by chromatographic separations coupled to quadruple and double-focusing magnetic sector ICPMS"*. Analytical Chemistry, 2000, 72, 5874-5880.

[18] C. Ferrarelo, M. R. Fernández de la Campa, H. Goenaga. Infante, M .L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, *"Improved separation of rabbit liver metallothioneins by FPLC-ICP-MS: a comparison with the conventional anion-exchange chromatography"*. Analusis, 2000, 28, 351-356.

[19] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, *"Quantification of metal distribution in metallotioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP-AES"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000, 368, 839-843.

[20] K. Polec, O. G. Arribas, M. P. Calvo, J. Szpunar, B. R. Ozonas, R. Lobinski, *"Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1363-1368.

[21] Y. Tan, P. Ager, W. D. Marshall, H. M. Chan, *"Approaches to the deternmination of metallothionein(s) by high-performance liquid chromatography-quartz tube atomic absorption spectrometry"*. Journal ofAnalytical Atomic Spectrometry, 1996, 11, 1183-1187.

[22] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Polymorphism and identification of metallothionein isofrms by reversed-phase hplc with on-line ion-spray mass spectrometric detection"*. Analytical Chemistry, 1998, 70, 2536-2543.

[23] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Speciation of metal complexes with biomolecules by reversed-phase HPLC wit ion-spray and inductively coupled plasma mass spectrometruc detection"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1998, 361, 267-273.

[24] H. Chassaigne, R. Lobiński*, "Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection"*. Journal of Chromatography A, 1998, 829, 127-136.

[25] H. Chassaigne, R. Łobiński, *"Detection of artefacts and peak identification in reversed-phase HPLC of metallothioneins by electrospray mass spectrometry"*. Talanta, 1999, 48, 109-118.

[26] H. Chassaigne, S. Mounicou, C. Casiot, R. Łobiński, M. Potin-Gautier, *"Detection and identification of rabbit liver metallothionein-2 subisoforms by capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and microbore HPLC-electrospray mass spectrometry"*. Analusis, 2000, 28, 357-360.

[27] G. van Yyncht, G. Bordin, A. R. Rodríguez, *"Rabbit Liver Metallothionein Subisoform Characteisation Using Liquid Chromatography Hyphenated to Diode Array Detection and Electrospray Ionisation Mass Spectrometry"*. Chromatographia, 2000, 52, 745-752.

[28] H. Goenaga Infante, B. Seiwert, F. C. Adams, *"Capabilities of Surfactant-modified High Performance Liquid Chromatography for Fractionation of Mammalian Metallothioneins"*. Chromatographia, 2002, 56, 553-557.

[29] H. Goenaga Infante, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Vesicle-mediated hih performance liquid chromatography coupled to hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry for cadmium sopeciation in fish cytosols"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 519-524.

[30] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, C. Sariego Muñiz, A. Sanz Medel, *"Metal distribution patterns in the mussel Mytilus edulis cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection"*. Analyst, 2000, 125, 2223-2229.

[31] K. A. High, B. A. Methven, J. W. McLaren, K. W. M. Siu, J. Wang, J. F. Klaverkamp, J. S. Blais, *"Physico-chemical characterization of metal binding proteins using HPLC-ICP-MS, HPLC-MA-AAS and electrospray-MS"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1995, 351, 393-402.

[32] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, *"Sampling and processing of biopsy samples for speciation studies of cytosolic metalloproteins"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 372, 491-494.

[33] K. A. High, V. J. Barthet, J. W. McLaren, J.S. Blais, "*Characterization of metallotionein-like proteins from Zebra mussels (Dreissena Polymorpha)"*. Environmental and Toxicology Chemistry, 1997, 16, 1111-1118.

[34] H. Goenaga Infante, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Cadmium-bound species in human urine using high-performance liquid chromatography-vesicular hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 1343-1348.

[35] J. F. Rubinson, K. A. Rubinson, *"Contemporary Chemical Analysis"*. 1998 Ed. Prentice-Hall. Nueva Jersey, Estados Unidos.

[36] D. Harris, *"Quantitative Chemical Analysis"*. 4ª edición 1998 Ed. W. H. Feeman. Nueva York, Estados Unidos.

[37] G. D. Christian, *"Analytical Chemistry"*. 4ª edición 1986 Ed. John Wiley & Sons. Nueva York, Estados Unidos.

[38] D. A. Skoog, F. J. Holler, D. M. West, *"Analytical Chemistry. An Introduction"*. 5ª edición 1990 Ed. Saunders College Publishing. Filadelphia, Estados Unidos.

[39] H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean, F. A. Settle, *"Instrumental Methods of Analysis"*. 6ª edición 1988 Ed. Wadsworth. California, Estados Unidos.

CAPÍTULO IV

OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN

INDICE

I- INTRODUCCIÓN 243
1.1- Métodos de preparación del extracto citosólico de mejillón 245
1.1.1- Métodos de preparación del extracto citosólico para la determinación de MTs 245
1.1.2- Extracción con líquidos presurizados (PLE) 248
II- OBJETIVO 253
III- PARTE EXPERIMENTAL 257
3.1- Reactivos 259
3.2- Material 261
3.3- Limpieza del material 263
3.4- Optimización de un método de preparación del extracto citosólico de mejillón por percusión 265
3.4.1- Comparación del método de preparación del extracto citosólico por percusión con otros métodos de preparación 270
3.4.2- Estudio de las características analíticas del método de preparación del extracto citosólico por percusión 271
3.4.2.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 271
3.4.2.2-Cálculo de la sensibilidad, LOD y LOQ 272
3.4.2.3- Precisión del método 273
3.4.3- Procedimiento propuesto para la preparación del extracto citosólico de mejillón 273
3.5- Optimización de un método de preparación del extracto citosólico asistido por extracción líquida presurizada (PLE) 275
3.5.1- Optimización de las condiciones de preparación del extracto citosólico asistido por PLE 277
3.5.1.1- Optimización del tiempo estático 279
3.5.1.2- Optimización de la presión 282
3.5.1.3- Optimización del número de ciclos 284
3.5.1.4- Optimización de la temperatura 286
3.5.2- Estudio de las características analíticas del método de preparación del extracto citosólico asistido por PLE y determinación de los metales ligados a la fracción **MLP-I** por HPLC-ICP-OES 289
3.5.2.1- Estudio de la linealidad y del efecto matriz 289

3.5.2.2- Estudio del LOD y LOQ 292
3.5.2.3- Estudio de la precisión 293
3.5.3- Procedimiento propuesto para la preparación del extracto citosólico asistido por PLE 293
3.6- Comparación de los métodos de preparación del extracto citosólico de mejillón por percusión y PLE 294
IV- CONCLUSIONES 297
V- BIBLIOGRAFÍA 301

INTRODUCCIÓN

1.1- MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN

1.1.1- MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MTs

Existen diversas referencias bibliográficas en relación a la preparación del extracto citosólico para la determinación de MTs tanto en tejido de mejillón (denominadas MLPs) como en tejidos de riñón o hígado de diferentes organismos mamíferos. La extracción se lleva a cabo de forma habitual con una disolución reguladora a pH neutro. La disolución reguladora más utilizada es la formada por el tris(hidroximetil)aminometano y el ácido clorhídrico (TRIS-HCl), en concentraciones entre 10 y 50 mM, las cuales proporcionan valores de pHs entre 7,4 y 9,0 **[1]**. Las metalotioneínas son un tipo de proteínas muy propensas a sufrir oxidaciones durante el proceso de extracción debido a su alto contenido en grupos cisteínicos. Durante dicha oxidación se forman puentes disulfuro produciendo copolimerizaciones o unión de las MTs a otras proteínas. Esto hace que tanto el proceso de homogeneización como el de separación de las MTs se lleven a cabo con disoluciones reguladoras desgasificadas y en presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol que actúa como antioxidante. Otras sustancias que se añaden de forma habitual a la disolución extractante son la azida sódica como agente antibacteriano y el fenilmetilsulfonilfluoruro como inhibidor de las proteasas. Una vez realizado el paso de homogeneización-extracción se procede a la centrifugación para separar ya definitivamente las MTs en disolución **[1, 2]**. Es recomendable, también, realizar un tratamiento de calentamiento, del sobrenadante, comúnmente a 60º C durante 15 min, para separar por precipitación las fracciones proteicas de alto peso molecular que pudieran ser coextraídas**[2]**.

El método más extendido para la preparación del extracto citosólico es la homogeneización del tejido fresco mediante la trituración con un dispositivo de cuchillas. Así, las partes blandas del mejillón húmedo se homogeneizan con una disolución reguladora TRIS-HCl 30mM (pH 8,6) conteniendo 0,1mM de fenilmetilsulfonilfluoruro y empleando un homogeneizador tipo Pollytron, centrifugando a continuación el extracto a 45000 rpm durante 90 minutos **[1, 3]**.

En otras aplicaciones, se varían algunos parámetros como la concentración de disolución reguladora, el modelo del sistema homogeneizador de trituración o las condiciones de centrifugación. Por ejemplo, *High et al.* **[4, 5]** realizan la preparación citosólica del mejillón

homogeneizando con una disolución reguladora TRIS-HCl 0,03 M (pH 8,6) y empleando un sistema de cuchillas Tekmar SDT Tissumizer bajo condiciones anóxicas y en presencia de un inhibidor de proteasas como fenimetilsulfonilfloururo al 0,1% (m/v). El proceso de homogenización-trituración se lleva a cabo durante 1 min empleando una potencia de 20000 rpm. A continuación, la mezcla se ultracentrifuga a 145000 g durante 90 minutos para obtener los extractos citosólicos que son guardados a -80º C para evitar así posibles oxidaciones o polimerizaciones de las MTs. También, algunos autores emplean cloruro sódico en la composición de la disolución reguladora extractante para mantener la fuerza iónica de la misma, o ditiotreitol en vez de mercaptoetanol, como agente reductor **[6, 7]**.

En tejidos de mamíferos, tales como riñón de cerdo, o de peces, como hígado y riñón de morena, se ha realizado la extracción con la disolución reguladora TRIS-HCl conteniendo sucrosa y a pH 7,4-8 **[8, 9]**. Bajo estas condiciones se ha encontrando una eficiencia en la extracción de las MTs variable en el rango 50-80% **[1]**. También, se ha usado una disolución reguladoraTRIS-HCl-sucrosa para extraer MTs de hígado fetal humano **[10]**, o una disolución formada únicamente por sucrosa 0,25 M **[11]**. En otros estudios se utiliza una disolución reguladora TRIS-HCl modificada con sucrosa, ácido ascórbico y mercaptoetanol **[12]**. Asimismo, destaca el empleo de oligopéptidos ciclados, como agentes antiproteolíticos, junto con el fenimetilsulfonilfluoruro, formando parte del extractante, en investigaciones sobre MLPs presentes en branquias y glándulas digestivas de diferentes moluscos bivalvos **[13-15]**.

Otros trabajos, como los desarrollados por *Miyairi et al.* **[16]**, emplean disoluciones de cloruro potásico 150mM para preparar el extracto citosólico a partir de tejidos de riñón e hígado de ratón.

En la determinación de Cd asociado a MLPs de lisosomas de tejido de riñón de moluscos, tras el proceso de extracción, se ha empleado la enzima pronasa. En dicho procedimiento, la homogeneización consiste en el empleo de un sistema de trituración y una disolución extractante de sucrosa 0,33 M, cloruro sódico 0,5 M y N–2–hidroxietilpiperacina–n–2–ácido etano sulfónico 10 mM, resultando una disolución de pH 7,6. A continuación, se realizan dos operaciones de centrifugación, una a 720 g durante 2 min y otra a 50000 g durante 30 min, con lo que se obtiene la sedimentación de los gránulos, lisosomas y mitocondrias. Se sigue con una resuspensión en el medio homogeneizado (15 ml) y la adición de pronasa (1,5 mg), que se deja actuar durante 1 hora a 30º C en un baño de agua. Después de permanecer toda la noche en hielo, la suspensión se

centrifuga a 50000 g durante 30 min. Por último se realiza otra resuspensión en agua destilada y otra centrifugación para obtener los lisosomas **[17]**.

Para la determinación de Cd ligado a las MTs presentes en el hígado de merluza, *Muñoz et.al*. **[18]** utilizaron el método propuesto por *Kundsen et al.* **[19]** en la determinación de las isoformas de MT en hígado fetal de oveja. En este caso, la muestra se homogeniza con una disolución reguladora TRIS-HCl 0,05 M de pH 7,3 y a continuación, se centrifuga a 15000 g durante 30 min añadiendo 2,3 ml de una mezcla etanol/acetonitrilo (1/3) por cada 2,3 ml de sobrenadante. Tras varios procesos de precipitación y centrifugación, el sólido se resuspende en la disolución reguladora TRIS-HCl usando para ello energía de ultrasonidos. A continuación, los extractos se calientan en baño de agua a 100º C durante 4 min, se centrifugan y el sobrenadante se lleva a un volumen fijo con la disolución reguladora TRIS-HCl.

El método de homogeinización y extracción más extendido es aquel en el que la muestra junto con la disolución reguladora de TRIS-HCl, pH variable entre 7,4 y 9, y 2-mercaptoetanol, cloruro sódico y fenilmetilsulfonilfluoruro se mezclan mediante un dispositivo de cuchillas tipo Pollytron. Tras centrifugación, el sobrenadante se somete a un paso de calentamiento en baño de agua a 60-70º C durante 15 min, procediendo finalmente a un proceso de ultracentrifugación.

El estudio descrito por *Ferrarello et al.* en numerosos trabajos **[20-24]** lleva a cabo la preparación del extracto citosólico a partir de 5 g de tejido de mejillón húmedo, los cuales se ponen en contacto con 5 ml de la disolución extractante formada por una disolución reguladora TRIS–HCl 10-10 mM y pH 7,4, modificada con 2-mercaptoetanol 5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 0,1 mM y cloruro sódico 25 mM. La mezcla se homogeneiza con un Ultraturrax a 13000 rpm durante 5 min y se centrifuga a 26000 rpm durante 30 min. El sobrenadante, conteniendo las MLPs, se calienta a 60º C durante 15 min y se ultracentrifuga a 4º C y a 15000 rpm. Este método de preparación del extracto citosólico se basa en el descrito por *Łobinski et al.* **[1]** y *Roesijadi et al.* **[6]**. Este mismo procedimiento preparativo ha sido también utilizado por los mismos autores para la especiación de las diferentes isoformas de MLPs en tejido de mejillón por técnicas electroforéticas **[25]**.

La totalidad de los sistemas de homogenización descritos emplean cuchillas para romper el tejido blando de la muestra y mezclarlo con el extractante. Ejemplos de estos dispositivos son los ya citados sistemas Ultraturax, Polytron o Physcotron. Otros sistemas, como Dounce o Potter-

Elverhjem, consiguen la mezcla de la muestra con el extractante mediante la acción de rotación y golpeo.

1.1.2- EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS (PLE)

La extracción de analitos (tanto orgánicos como inorgánicos) de una matriz sólida ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos. En la extracción podemos identificar 5 procesos: la desorción del compuesto de los sitios activos de la matriz, la difusión dentro de la matriz, la solubilización y la difusión dentro del extractante, y la recolección de los solutos extraídos. El primer paso va a ser el limitante en la mayoría de las aplicaciones medioambientales, sobre todo en aquellos casos en los que se extraen contaminantes en suelos o sedimentos. Sin embargo, para otras matrices, los pasos de difusión o de solubilización suelen ser los más importantes **[26]**.

Existen numerosas técnicas de extracción que van desde las más convencionales como la extracción Soxhlet o extracción con ultrasonidos, a las más modernas como la extracción con líquidos presurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*), la extracción asistida con microondas (MAE, *Microwave Assisted Extraction*), o la extracción con fluidos supercríticos (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*). Las primeras son técnicas que usan grandes volúmenes de disolvente orgánico, además de ser lentas y laboriosas y de baja eficiencia en muchos casos. Por ello, estas técnicas están siendo sustituidas en los últimos años por las segundas, las cuales son más rápidas, eficientes, menos contaminantes, baratas y en muchos casos automatizables **[26-29]**.

La extracción con líquidos presurizados se lleva a cabo a temperaturas que superan el punto de ebullición del disolvente. Además, implica que la presión dentro de la celda de extracción sea lo suficientemente elevada como para mantener en estado líquido el disolvente, de modo que tanto la presión como la temperatura van a ser factores limitantes en todo el proceso **[28]**. La combinación de altas presiones y temperaturas permite extracciones rápidas y eficientes. El uso de temperaturas altas reduce la viscosidad del disolvente, lo que permite que éste se introduzca mejor en la matriz y favorezca la solubilización de los analitos **[29]**.

Desde la introducción de la extracción con líquidos presurizados, la nomenclatura dada a esta técnica ha sido diversa. El nombre más utilizado es extracción acelerada con disolventes (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*), y así se refiere en el 80-90% de las publicaciones sobre

esta técnica. Esto es debido a que esta técnica fue desarrollada y comercializada por Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA), quien dio este nombre comercial a la misma. Sin embargo, a lo largo de los últimos años se le han otorgado a la técnica numerosos nombres alternativos **[26, 29, 30]**. Así, tenemos la extracción de fluidos presurizados (PFE, *Pressurized Fluid Extraction*), la extracción con líquidos presurizados (PLE) **[26, 28-31]**, la extracción con solventes presurizados (PSE, *Pressurized Solvent Extraction*) **[26, 31]**, la extracción de aumento de disolvente (ESE, *Enhanced Solvent Extraction*), derivada de la SFE **[26]**, la extracción con disolventes calientes presurizados (PHSE, *Pressurized Hot Solvent Extraction*) **[28, 30]**, la extracción con disolventes a alta presión (HPSE, *High Pressurized Solvent Extraction*), la extracción con disolventes a altas temperaturas y altas presiones (HPHTSE, *High Pessurized Hot Solvent Extraction*) y la extracción con disolventes subcríticos (SSE, *Subcritical Solvent Extraction*) **[28, 30]**. Cuando se utiliza agua como disolvente aparecen nombres como extracción con agua subcrítica (SWE, *Subcritical Water Extraction*), extracción con agua caliente (HWE, *Hot Water Extraction*), extracción con agua caliente presurizada (PHWE, *Pressurized Hot Water Extraction*) o extracción con agua a alta temperatura (HTWE, *Hot Temperature Water Extraction*) **[28]**. El término más aceptado es el de extracción con líquidos presurizados (PLE). La Agencia para la Protección del Medioambiente (EPA, *Environmental Protection Agency*) ha adoptado desde 1996 el término extracción con fluidos presurizados (PFE) para referirse a esta técnica de extracción en el método 3545 recogido en U. S. EPA SW-846 Methods, recomendado para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles presentes en matrices sólidas **[26, 28-32]**.

Hay dos modos de llevar a cabo la extracción con líquidos presurizados, modo estático y modo dinámico **[30]**. El proceso en modo estático comienza con el calentamiento de la celda que contiene la muestra. Esto se produce durante la etapa de equilibrado, que es aproximadamente de 5 min, y es seguido por lo que se llama proceso de extracción estática, ya que ésta se lleva acabo en condiciones estáticas. El proceso dinámico se puede comparar con la cromatografía líquida de alta resolución a altas temperaturas, si el relleno de la columna se sustituye por la muestra. En este modo de operación se consume más disolvente que en el modo estático, lo que hace que se utilize menos **[27]**. La mayor diferencia entre ambos es, pues, que en el modo dinámico se está continuamente bombeando disolvente a la celda de extracción, siendo los flujos de entre 0,5 y 2,5 ml/min **[29]**.

Como ya se ha indicado, los factores que van a influir en la extracción son fundamentalmente la presión, la temperatura, el tipo de disolvente y la composición de la matriz.

Un incremento en la temperatura provoca un incremento en la solubilidad de los analitos y en la difusión; por otro lado, provoca una disminución de la viscosidad del disolvente y de la tensión superficial y debilita y rompe los enlaces entre la matriz y los analitos **[26, 27, 29, 32]**. Uno de los motivos de usar altas presiones es para mantener el disolvente en estado líquido por encima del punto de ebullición **[27, 29].** También se utilizan altas presiones para facilitar la extracción de aquellos analitos que se encuentran fuertemente atrapados en la matriz **[26, 32]**. En cuanto al tipo del disolvente, se puede utilizar una amplia variedad de los mismos; en general, se suelen evitar aquellos que son bases y ácidos fuertes debido a que son corrosivos **[27]**, así como los disolventes de bajas polaridades. A menudo se utilizan disolventes de fuerza iónica elevada para extraer analitos unidos fuertemente a la matriz **[29]**. Para extraer compuestos lipofílicos y apolares se utilizan disolventes no polares, de polaridad media o aquellos formados por la mezcla agua-disolvente inmiscible como el hexano, pentano, pentano/diclorometano y ciclohexano/etilacetato. Si lo que queremos es extraer compuestos polares o hidrofílicos utilizaremos disolventes más polares como el acetonitrilo, el metanol o el agua. Las mezclas de disolventes de alta y baja polaridad con frecuencia producen mejores extracciones. Asimismo, muchas veces se le añade al disolvente un modificador para aumentar su actuación **[28]**. Hay que tener en cuenta que la adsorción y retención de los analitos se ve afectada por las características físico-químicas, el tipo de componentes presentes y el diámetro de partícula de la muestra **[27]**. Otro parámetro que hay que tener en cuenta es el tiempo de extracción; a menudo 5 min suele ser un tiempo suficiente (este tiempo es el recomendado por la EPA en su método 3545 **[29]**.

Antes de depositar la muestra en la celda de extracción es aconsejable proceder a un pretratamiento que implica un triturado de la misma (entre 100-1000μm), para disminuir el tamaño de partícula y así favorecer el proceso de difusión. En el caso de emplear muestras húmedas, a menudo se requiere un secado mediante la utilización de agentes desencantes como el sulfato sódico, la tierra de diatomeas o la celulosa. Incluso, se pueden utilizar otros procedimientos como la liofilización o secado por congelación **[28, 29]**. Para evitar la agregación de partículas de la muestra que puedan influir en la eficiencia de extracción, se usa en muchas ocasiones un agente dispersante como tierra de diatomeas o partículas de Teflón **[28]**.

Tras la introducción de la muestra en la celda de extracción, ésta se puede someter a dos modos de trabajo distintos, esto es, modo de precalentamiento o modo de prellenado. En el modo de precalentamiento, primero se calienta el horno a una temperatura adecuada y a continuación se coloca la celda dentro. Después de un tiempo determinado se introduce el disolvente dentro de la

celda y comienza el proceso de extracción. Por el contrario, en el modo de prellenado, la celda con la muestra y el disolvente se introduce dentro del horno. Este último modo permite eliminar el aire que queda retenido en los intersticios evitando la degradación de aquellos compuestos que se oxidan fácilmente **[27]**.

El procedimiento global lo podemos resumir en los siguientes pasos:

- Introducción de la muestra en la celda de extracción (para evitar que la frita metálica de la celda se atasque ésta se recubre con papel de filtro).
- Llenado de la celda de extracción con el disolvente.
- Calentamiento y presurización de la celda a unos valores fijos (paso de preextracción), este paso dura entre 5-10 min.
- Extracción de la muestra en un cierto tiempo, de 5-20 min (paso de extracción estática).
- Transferencia del disolvente al vial colector y limpieza de la muestra con disolvente limpio.
- Purga de la celda con un gas inerte para evitar pérdidas o efectos memoria. **[26, 29, 33]**

Las aplicaciones de esta técnica de extracción están encaminadas a la extracción de compuestos orgánicos contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, *Polyciclic Aromatic Hydrocarbons*) **[27-29, 32, 34-36]**, alquilfenoles **[28]** y compuestos policlorados como los bifenilos policlorados (PCBs, *Polyciclic Chlorinated Biphenyls*) **[27-29, 32, 37, 38]** presentes en muestras biológicas, medioambientales y alimentos **[27-29, 34]**. También, esta técnica se ha utilizado en la extracción de hidrocarburos presentes en materias primas **[32]** y en material particulado **[35]**.

Más recientemente, la PLE se ha aplicado en la extracción de compuestos organofosforados, N-metilcarbamatos, organonitrogenados, organosulfurados **[28]** o organoclorados **[28, 29]**, así como en la extracción de toxinas naturales **[28]** o compuestos organometálicos de As, Sn y Se **[28, 31]**.

Es importante, también, su utilización en la extracción de compuestos activos farmacológicamente presentes en plantas o hierbas, polifenoles que actúan de antioxidantes, aceites esenciales o materia grasa presente en alimentos **[29]**.

Otros compuestos que se han extraído mediante el uso de PLE son las dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs, *Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins*) **[29, 39]**, los difenil éter polibromados (PBDEs, *Polybrominated Diphenyl Ethers*) o las dibenzo-p-dioxinas polibromadas/dibenzofuranos (PBDD/DFs, *Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins/Dibenzofurans*) **[40]**. En los últimos años, se ha aplicado a la extracción de vitaminas, musk de perfumes **[28]** y antioxidantes **[33]**.

Como puede verse, la mayor parte de las aplicaciones de la PLE se refieren a compuestos orgánicos y a matrices sólidas, secas y previamente pulverizadas. A fecha de la redacción de la presente memoria, no existe ninguna aplicación de la PLE para la extracción de compuestos de alto peso molecular (MTs). Además, dado que la extracción de MTs, en nuestro caso MLPs, ha de llevarse a cabo empleando tejido fresco (húmedo), la aplicación de la PLE para la preparación del extracto citosólico a partir de tejido de mejillón húmedo constituye todo un reto.

OBJETIVO

OBJETIVO

El objetivo de la investigación llevada a cabo en el presente capítulo es el de desarrollar nuevos métodos de preparación del extracto citosólico que permitan una extracción sencilla y rápida de las MLPs presentes en el tejido blando del mejillón. Los métodos estudiados se basaron en el empleo de un sistema de percusión (Stomacher) y en el empleo de la extracción líquida presurizada (PLE).

Con el primer método se determinará la concentración de metal ligado a compuestos de bajo peso molecular (Cr, Cd, Pb, Cu y Zn) por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) o espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS).

El segundo método consistirá en la aplicación de la extracción líquida presurizada para la preparación del extracto citosólico. En este caso, se determinará el metal (Al, Ba, Cu, Fe, Zn y Mn, entre otros) ligado a la isoforma MLP-I a través de un sistema *off line* HPLC y espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES).

Como último objetivo, estos dos procedimientos de extracción se aplicarán a 14 muestras de mejillón de la Ría de Arousa (campaña invierno del 2002), realizándose un estudio comparativo de los resultados de concentración metálica obtenidos con ambos métodos de extracción y mediante *off line* HPLC-ICP-OES.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de cloruro de arsénico (III) de 1000 µg/ml de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Disolución patrón de nitrato de níquel de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de vanadio de 997±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de estaño (II) de 1000±5 µg/ml de BDH (Poole, Reino Unido).
* Disolución patrón de cloruro de cobalto de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de silicio de 1005±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de dióxido de selenio de 1001±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de bario de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de nitrato de estroncio de 999±2 µg/ml (Mecrk).
* Disolución patrón de nitrato de aluminio de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de hierro (III) de 1000 µg/ml (Pekin Elmer).
* Disolución patrón de nitrato de manganeso de 1000±0,002 µg/ml de Panreac (Barcelona, España).
* Disolución patrón de nitrato de magnesio de 10000 mg/L preparado a partir de nitrato de magnesio (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de paladio de 1000 mg/L (Perkin Elmer).
* Disolución de Triton X-100 (Merck).
* Tierra de diatomeas 95% SiO_2 de Aldrich (Milwankee, Estados Unidos).
* Tris-(hidroxietil)-aminometano de Riedel-de Haën (Steinheim, Suiza).
* 2-Mercaptoetanol 99% (Fluka).
* Fenilmetilsulfonil fluoruro 99% (Fluka).
* Cloruro sódico (Merck).
* Ácido clorhídrico 37% de J. T Baker (Deventer, Holanda).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Argón, Airliquide N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).

* Acetileno Airliquide N-26 (Jaime Rey).

* Nitrógeno Airliquide B-50 (Jaime Rey).

* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp. (Massachusetts, Estados Unidos).

3.2- MATERIAL

* Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 1100B de Perkin-Elmer, con corrector de fondo de lámpara de deuterio. Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Cámara de grafito HGA-400 (Perkin Elmer).
* Muestreador automático AS-40 (Perkin Elmer).
* Tubos de grafito pirolítico con plataforma L´Vov (Perkin Elmer).
* Espectrofotómetro de absorción / emisión atómica de llama modelo 3110 (Perkin Elmer).
* Especrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción modelo Optima 3300 DV (Perkin Elmer).
* Muestreador AS 91 (Perkin Elmer).
* Bomba Peristáltica (Perkin Elmer).
* Bomba de HPLC 515 de Waters (Milford, MA, Estados Unidos).
* Detector de UV-VIS 486 (Waters).
* Software Millennium (Waters).
* Inyector, válvula de inyección Rheodyne 7725i de Rheodyne (Cotati, CA, Estados Unidos).
* Jeringa Hamilton de 100 µl modelo 81030 de Hamilton (Reno, Nevada, Estados Unidos).
* Columna de vidrio de intercambio iónico DEAE-5PW, 8X75 mm (Waters).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* ASE-200 system, equipado con celdas de extracción de acero inoxidable de 11 ml de capacidad y filtros de celulosa Dionex (D28, 1,983 cm de diámetro) de Dionex (Sunmyvale, CA, Estados Unidos).
* Lámpara de cátodo hueco de Cr de Cathodeon (Cambridge, Reino Unido).
* Lámpara de cátodo hueco de Cd (Perkin Elmer).
* Lámpara de cátodo hueco de Cu (Cathodeon).
* Lámpara de cátodo hueco de Zn (Perkin Elmer).
* Lámpara de descarga de electrodos de Pb (Perkin Elmer).
* Fuente para lámparas de descarga modelo System 1 (Perkin Elmer).
* Agitador Vibromatic de Selecta (Barcelona, España).
* Centrífuga Centromix, modelo 540 (Selecta).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen, modelo 2K15 de Sigma (Osterode, Alemania).
* Peachímetro Thermo Orion, modelo 720 de Orion Research (Cambridge, Reino Unido).

* Electrodo Thermo Orion 8102BN (Orion).

* Balanza Sartorios BL 610 (Selecta).

* Balanza Sartorius BP 121 S (Selecta).

* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.

* Filtros de acetato de celulosa no estéril de diámetro de poro 0,20 μm de Albet (Barcelona, España).

* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

3.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón. A continuación, se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10% durante al menos 48 horas. Posteriormente, se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q y por último el material se seca en estufa. Una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena.

3.4- OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN POR PERCUSIÓN

El primer método de extracción que se optimizó está basado en el mecanismo de percusión entre la muestra y el extractante a través del dispositivo comercial Stomacher (**figura 4.1**). Como ya se comentó con anterioridad, dicho sistema produce la homogeneización a través del mecanismo de percusión o machado, en un medio exento de contaminantes metálicos. Este procedimiento es, a priori, más fiable que el que utiliza sistemas del tipo Ultra Turrax o Omni Mixer, debido a que evita el empleo de cuchillas metálicas en el proceso de homogeneización, estando contenida la muestra y el extractante en el interior de una bolsa de plástico libre de metales, bolsa sobre la cual se ejercen las fuerzas mecánicas. En la **figura 4.1** se muestra el dispositivo que se ha utilizado. El estudio de las distintas variables que afectan a la preparación del extracto citosólico se llevó a cabo determinando los contenidos de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligados a los compuestos de bajo peso molecular (MLPs entre ellos) siguiendo las condiciones de medida por ETAAS (Cr, Cd y Pb) y FAAS (Cu y Zn) detalladas en el Capítulo II (**tablas 2.9, 2.10** y **2.11**)



Figura 4.1: Representación del homogenizador Stomacher utilizado en el proceso de preparación del extracto citosólico de mejillón por percusión

Las variables estudiadas en la preparación del extracto citosólico mediante el empleo del dispositivo Stomacher fueron la relación de masa de mejillón[1]/volumen de extractante[2] y el tiempo de homogenización. Ambas variables se estudiaron de manera conjunta empleando un diseño composicional centrado a dos niveles 2^2+star con un valor central y 2 réplicas. Los valores superior e inferior para ambas variables se muestran en la **tabla 4.1**.

Tabla 4.1: Intervalos de estudio del diseño composicional

Variable de estudio	Valor inferior	Valor superior
Tiempo/min	7,5	25
Relación M/V/(g/ml)	0,5	2,0

Una vez fijados los valores superior e inferior para cada intervalo a estudiar se creó una matriz de diseño composicional 2^2+2*2+1, mediante el programa estadístico Unscrumbler 7.01. De esta forma las variables no sólo toman los valores superiores e inferiores propuestos por nosotros, sino que también toman el valor central del intervalo y valores cercanos a los valores superiores e inferiores de cada intervalo (valores estrella). La matriz obtenida es la mostrada en la **tabla 4.2**.

[1] La masa fue constante e igual 10 g excepto cuando la relación M/V es 0,189, que fue de 5 g
[2] Los valores para la composición del extractante (concentración de TRIS-HCl, NaCl, PMSF y 2-MEC, así como el pH) se mantuvieron constantes en todos los experimentos siguiendo las recomendaciones de Łobinski y Roesijadi **[1, 6]**

Tabla 4.2: Matriz de diseño composicional para la optimización del procedimiento de preparación del extracto citosólico de mejillón por percusión

Experimento Nº	Tiempo/min	Relación M/V/(g/ml)
1	3,88	1,25
2	3,88	1,25
3	28,62	1,25
4	28,62	1,25
5	16,25	0,19
6	16,25	0,19
7	16,25	2,31
8	16,25	2,31
9	7,50	0,50
10	7,50	0,50
11	25,00	0,50
12	25,00	0,50
13	7,50	2,00
14	7,50	2,00
15	25,00	2,00
16	25,00	2,00
17	16,25	1,25
18	16,25	1,25

Una vez que tenemos la matriz realizamos los experimentos siguiendo el esquema de trabajo mostrado en el Capítulo II (**figura 2.1)**, pero variando el tiempo de homogenización y la relación M/V. A continuación, se determinó el contenido de Cr, Cd y Pb por ETAAS utilizando los programas optimizados recogidos en el Capítulo II (**tabla 2.9** y **2.10**) y el Cu y el Zn por FAAS, en las condiciones óptimas (**tabla 2.11**) y empleando la técnica de adición estándar como método de calibración.

Los resultados de concentración de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn obtenidos se muestran en la **tabla 4.3.**

Tabla 4.3: Resultados de concentración expresados en (μg/g) para cada uno de los metales en cada experimento

Experimento Nº	[Cr]/(μg/g)	[Cd]/(μg/g)	[Pb]/(μg/g)	[Cu]/(μg/g)	[Zn]/(μg/g)
1	0,03	0,03	0,01	0,17	1,69
2	0,03	0,02	0,01	0,17	2,27
3	0,03	0,03	0,01	0,14	5,64
4	0,03	0,03	0,01	0,12	2,87
5	0,04	0,06	0,05	0,35	3,99
6	0,04	0,07	0,04	0,35	2,86
7	0,02	0,02	0,01	0,09	1,27
8	0,02	0,01	0,01	0,09	0,83
9	0,03	0,04	0,02	0,29	6,25
10	0,03	0,04	0,02	0,26	2,96
11	0,03	0,03	0,01	0,20	2,66
12	0,03	0,03	0,01	0,20	3,24
13	0,03	0,02	0,01	0,11	2,39
14	0,02	0,02	0,01	0,09	1,55
15	0,02	0,03	0,01	0,09	2,00
16	0,02	0,03	0,01	0,09	1,85
17	0,02	0,03	0,01	0,12	2,83
18	0,02	0,04	0,01	0,12	2,15

Los resultados de las concentraciones se introducen en la matriz del diseño composicional y se obtienen las superficies de respuesta, que nos darán las condiciones óptimas de trabajo. En las **figuras 4.2, 4.3** y **4.4** podemos ver las superficies de respuesta obtenidas para el Cr, Cd y Zn, respectivamente. Según los valores estadísticos obtenidos no hay relación entre las variables y éstas son independientes entre sí. Además, el tiempo no es una variable estadísticamente significativa, mientras que se obtienen las mayores concentraciones de metal ligado a los compuestos de bajo peso molecular cuanto menor es la relación M/V.

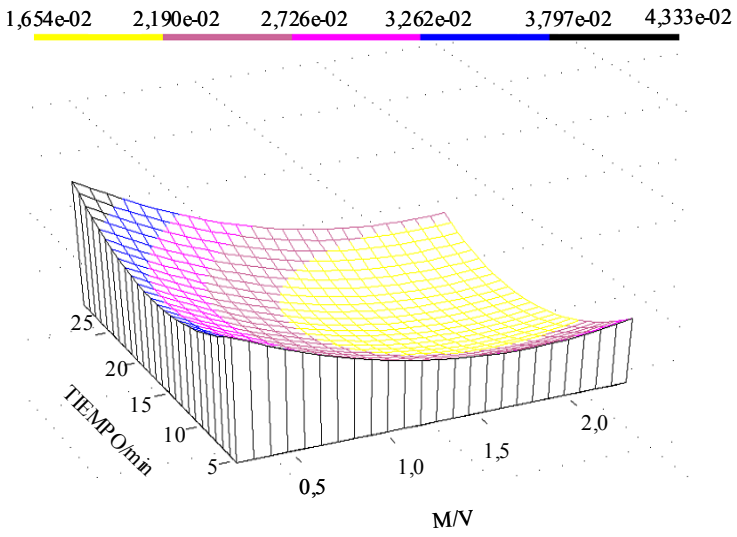


Figura 4.2: Superficie de respuesta para el Cr ligado a sustancias de bajo peso molecular

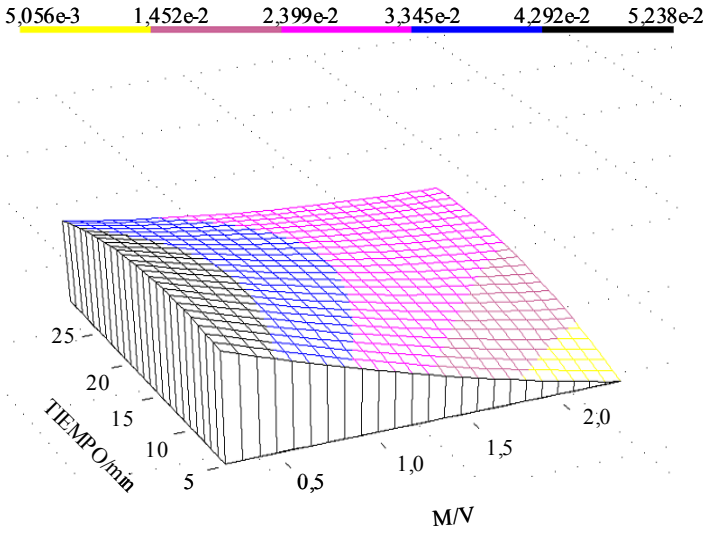


Figura 4.3: Superficie de respuesta para el Cd ligado a sustancias de bajo peso molecular

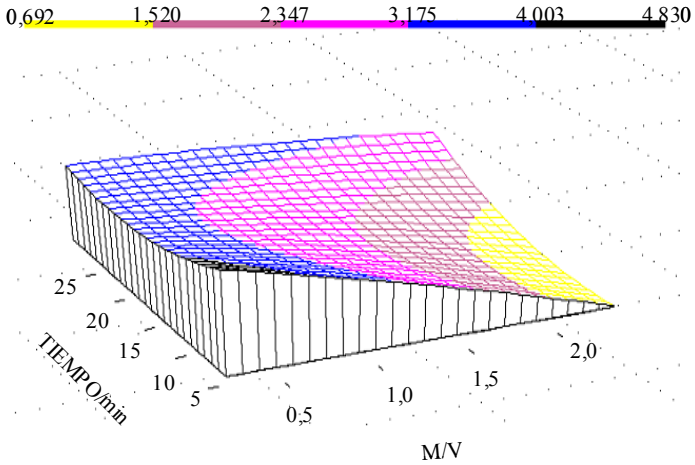


Figura 4.4: Superficie de respuesta para el Zn ligado a sustancias de bajo peso molecular

Así, se seleccionaron los intervalos óptimos que muestran en la **tabla 4.4**.

Tabla 4.4: Intervalos óptimos obtenidos para las variables estudio

Variables	**Intervalo**
Tiempo/min	3,88-28,62
Relación M/V/(g/ml)	0,19-0,36

Como para el tiempo tenemos un intervalo óptimo bastante amplio se decidió tomar como tiempo de homogenización 5 min, mientras que el volumen de extractante para 5 g de mejillón húmedo y relación M/V 0,19 fue 26,4 ml.

3.4.1- COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO POR PERCUSIÓN CON OTROS MÉTODOS DE PREPARACIÓN

El procedimiento optimizado se comparó con el propuesto por *Łobinski et al.* **[1]**, los cuales utilizan como sistema de homogenización un sistema tipo Omni Mixer donde la homogenización se realiza mediante el triturado de la muestra junto al extractante. Se prepararon tres extractos con sus respectivos blancos, por cada método, y se midió el contenido en Cd, Cr, Cu y Zn. En la **tabla 4.5** se recoge la media de concentración para cada metal en los tres extractos y sus blancos preparados por ambos métodos.

Tabla 4.5: Resultados para el Cr, Cd, Cu y Zn ligados a sustancias de bajo peso molecular en extractos citosólicos preparados por percusión (Stomacher) y triturado (Omni Mixer)

Elemento	Stomacher		Omni Mixer	
	Extracto de Mejillón	Blanco[a]	Extracto de Mejillón	Blanco[a]
Cr(µg/g)	0,03±0,01	0,0050±0,0002	0,16±0,01	0,071±0,016
Cd(µg/g)	0,02±0,01	0,0030±0,0001	0,02±0,01	0,0040±0,0001
Cu(µg/g)	0,10±0,01	0,0010±0,0001	0,12±0,01	0,0010±0,0001
Zn(µg/g)	2,73±0,28	0,0080±0,0002	2,58±0,17	0,0070±0,0003

[a]Unidades de Absorbancia

Se puede ver que los resultados son similares para todos los metales menos para el Cr para el cual existe un problema de contaminación cuando el extracto se prepara por el procedimiento clásico. Esto también queda patente en el blanco, el cual presenta un valor de concentración de Cr bastante elevado. Al aplicar un test de ANOVA al 95% de confianza se comprueba que la eficiencia del procedimiento de preparación del extracto citosólico por percusión (Stomacher) es comparable con la eficiencia del procedimiento de preparación con Omni Mixer, pero además con la minimización de la contaminación por Cr.

3.4.2- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO POR PERCUSIÓN

3.4.2.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

Se realizó una comparación estadística mediante la aplicación de ANOVA y el test de *Barlett* y *Cochran* a las pendientes de las rectas de calibrado y adición obtenidas en diferentes días para el estudio del efecto matriz. Las concentraciones de los patrones en cada una de las disoluciones empleadas para la obtención de las rectas de calibrado y adición se recogen en la **tabla 4.6**, mientras que las medias de las pendientes de calibrado acuoso y adición para los cinco elementos se presentan en la **tabla 4.7**. Los resultados muestran que hay una diferencia significativa entre las pendientes de la recta de calibrado y adición en las determinaciones de Cd y Pb ligados a sustancias de bajo peso molecular determinados por ETAAS y para las fracciones de Cu y Zn ligados a sustancias de bajo peso molecular determinados por FAAS, no ocurriendo esto para el Cr asociado a sustancias de bajo peso molecular. Por lo tanto, existe efecto matriz en las

determinaciones de Cd, Pb, Cu y Zn asociados a sustancias de bajo peso molecular, siendo necesario la determinación de éstos a través de la recta de adición.

Tabla 4.6: Concentraciones de patrón para construir las rectas de calibrado y adición

Patrón Nº	[Cr]/(µg/l)	[Cd]/(µg/l)	[Pb]/(µg/l)	[Cu]/(µg/ml)	[Zn]/(µg/ml)
1	0	0	0	0	0
2	2	0,5	5	0,5	0,05
3	4	1,0	10	1,0	0,1
4	6	2,0	20	2,0	0,2

Tabla 4.7: Pendientes de las rectas de Calibrado Acuoso y Adición expresadas como media±sd para n=7

Pendientes (l/µg)		
	Calibrado Acuoso	**Adición**
Cr	0,039±0,001	0,053±0,011
Cd	0,0201±0,003	0,0190±0,004
Cu [a]	0,199±0,002	0,151±0,008
Pb	0,0020±0,0003	0,0043±0,0003
Zn [a]	0,805±0,024	0,472±0,026

[a](l/mg)

3.4.2.2-CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD, LOD Y LOQ

Para el cálculo de la sensibilidad, LOD y LOQ, se tienen en cuenta las definiciones y ecuaciones ya definidas en el Capítulo I. Así, los resultados obtenidos para cada metal se recogen en la **tabla 4.8**.

Tabla 4.8: Masa característica, Sensibilidad, LOD y LOQ

	Masa Característica/(pg)	Sensibilidad/(µg/ml)	LOD/(µg/g)[a]	LOQ/(µg/g)[a]
Cr	5,7±0,19	-	0,003	0,010
Cd	1,3±0,08	-	0,0006	0,002
Pb	27,8±1,09	-	0,007	0,023
Cu	-	0,038	0,100	0,333
Zn	-	0,012	0,025	0,083

[a]Valor referido a 5 g de mejillón

3.4.2.3- PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión del método, definida a través del coeficiente de variación (Capítulo I) se estudió sometiendo cinco veces al proceso de preparación del extracto citosólico por percusión una muestra de mejillón y midiendo por duplicado los contenidos de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligados a los compuestos de bajo peso molecular. Los resultados se muestran en la **tabla 4.9**.

Tabla 4.9: Precisión del método para cada uno de los metales

	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn
CV/(%)	7	6	8	9	6

3.4.3- PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN

A la vista de los resultados obtenidos, el procedimiento propuesto para la preparación del extracto citosólico de mejillón por percusión y posterior determinación del Cr, Cd y Pb asociado a las sustancias de bajo peso molecular por ETAAS, y Cu y Zn por FAAS, es el siguiente:

1. 5 g de mejillón húmedo se ponen en contacto con 26,3 ml de disolución extractante 10 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 25 mM NaCl, 5 mM 2-Mec y 0,1 mM PMSF, en una bolsa para Stomacher.
2. Se homogeniza la mezcla durante 5 min a potencia de percusión alta.

3. La mezcla se centrifuga a 3000-4000 rpm durante 30 min.
4. Después de decantar el sobrenadante, éste se recoge en un tubo de polietileno y se calienta en baño de agua a 60°C durante 15 min.
5. Tras la precipitación de las proteínas terciarias, la mezcla se ultracentrifuga a 15300 rpm y 4°C durante 30 min.
6. Se recoge el sobrenadante y se lleva 25 ml con disolución extractante.
7. Finalmente, se determinan los contenidos de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociados a las sustancias de bajo peso molecular (MLPs) por ETAAS y FAAS

3.5- OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO ASISTIDO POR EXTRACCIÓN LÍQUIDA PRESURIZADA (PLE)

Dada la escasa bibliografía respecto al empleo de la técnica PLE sobre muestras húmedas, se llevaron a cabo una serie de experiencias encaminadas a seleccionar el mejor agente dispersante, así como la mejor forma de homogenización de la muestra previa al llenado de las celdas de extracción.

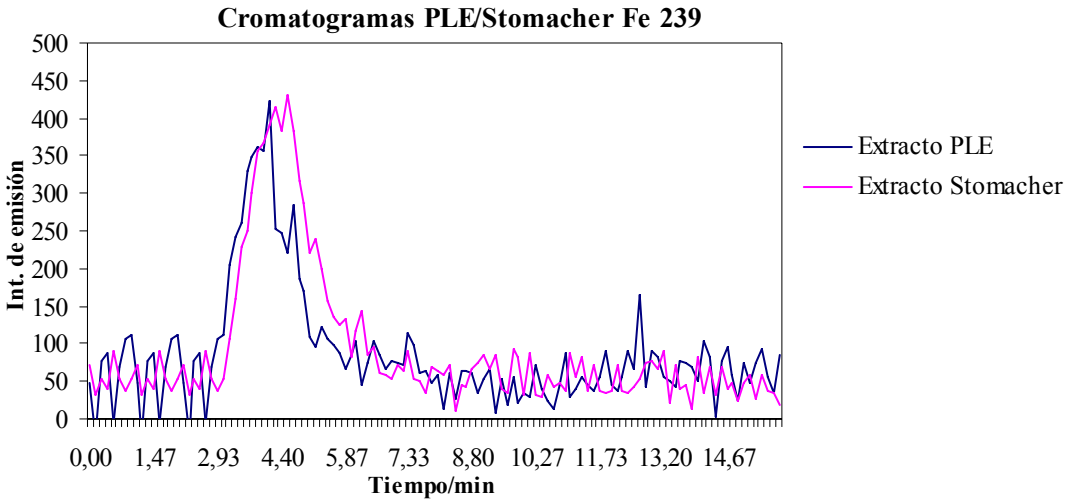
En los primeros experimentos, se observó que era el necesario fijar la presión en un valor superior a 1000 psi para que la disolución extractante pudiera atravesar la masa compacta de tejido de mejillón que se formaba en el interior de la celda de extracción. A presiones bajas (500 y 1000 psi) la resistencia de la muestra al paso del disolvente paralizaba la ejecución del programa de extracción.

Por otra parte, las experiencias preliminares llevaron a estudiar dos tipos de agentes dispersantes; arena ultrapura y tierra de diatomeas. En un principio, el llenado de la celda de extracción se llevó a cabo depositando una capa de agente dispersante y a continuación el tejido de mejillón (5 g) seguido de otra capa de dispersante. Bajo estas condiciones y aún empleando presiones de extracción elevadas, el sistema se paraba como consecuencia de la imposibilidad de introducir el disolvente. Además, el procedimiento era poco reproducible y el volumen de extractante tras el proceso de extracción variaba de 5 a 10 ml bajo las mismas condiciones de preparación de la celda y de extracción.

Finalmente, se procedió a mezclar en un mortero de ágata la muestra de mejillón húmeda (5 g) con el agente dispersante (2 g). El agua de la muestra era absorbida por el agente dispersante y se obtuvo una papilla seca la cual se introdujo en las celdas de extracción. Empleando valores de presión superiores a 1000 psi, se confirmó un correcto funcionamiento del equipo, no encontrándose variación apreciable en el volumen del extracto y eliminándose problemas de introducción del disolvente (extractante) en las celdas. Estos estudios nos permitieron seleccionar la forma de llenado de las celdas y el tipo de agente dispersante (tierra de diatomeas), ya que éste conseguía secar perfectamente la muestra. Otros agentes dispersantes como la arena ultrapura no llevaban a una buena reproducibilidad; y agentes desecantes como el sulfato sódico anhidro, recomendado por diversos autores en el tratamiento de muestras húmedas, no son convenientes en nuestro caso ya que la disolución extractante es una disolución acuosa (disolución reguladora

TRIS-HCl).

A modo de ejemplo, en la **figura 4.5** se muestran dos cromatogramas superpuestos para la línea del Fe239 obtenidos por HPLC-ICP-OES tras la aplicación de la preparación del extracto citosólico mediante percusión (Stomacher) y tras la aplicación de PLE bajo condiciones no óptimas. Como puede verse, existe una buena concordancia que nos lleva a pensar en la posibilidad del empleo de la técnica PLE para asistir la preparación del extracto citosólico de mejillón.



Figuras 4.5: Cromatogramas para la línea de Fe de extractos citosólicos obtenidos por percusión (Stomacher) y PLE

3.5.1- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO ASISTIDO POR PLE

El disolvente utilizado para realizar la extracción es una disolución acuosa TRIS-HCl 10mM, 25mM NaCl, 5mM 2-Mec y 0,1mM PMSF de pH 7,4. El método de optimización que se aplicó fue de tipo univariante, es decir, se varió el valor asignado a la variable objeto de estudio mientras se mantenía constante el valor para el resto de las variables.

Las variables a estudiar fueron el tiempo estático, el número de ciclos, la presión y la temperatura de extracción. Una vez obtenido el extracto citosólico con cada combinación de variables, se procedió a la separación cromatográfica por HPLC de intercambio iónico y la fracción correspondiente a la MLP-I se recogió y analizó para los metales ligados a esta proteína por ICP-OES. También, se procedió a una medida *on line* HPLC-ICP-OES para observar el perfil cromatográfico de cada metal en el proceso de optimización.

Para la realización de este estudio nos basamos en los valores de flujo y concentración de fase móvil optimizados en el proceso de separación cromatográfica de las isoformas de MLP que quedan recogidos en el Capítulo III. En la **tabla 4.10** se pueden observar las condiciones cromatográficas de trabajo empleadas.

Tabla 4.10: Condiciones de la separación cromatográfica tras la preparación del extracto sistólico mediante PLE

Tipo de Columna	Fase móvil/mM	Flujo ml/min	Tiempo de recogida del extracto/min	Volumen de inyeción/µl	Modo de elución	Adquisición de los datos	λ/nm
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 75-75 mM pH 7,4	0,6	3´15´´	200	Isocrático	Detección en UV-VIS, ICP-OES	254

Las condiciones de medida en el ICP-OES se resumen en la **tabla 4.11**.

Tabla 4.11: Condiciones de medida por ICP-OES

Potencia de Radiofrecuencias/W	1300	
Flujo de Argon/l min^{-1}	Plasma	15,0
	Auxiliar	1,0
	Nebulización	0,85
Tipo de Nebulización	GemCone de flujo cruzado y cámara de nebulización ciclónica	
Flujo de muestra/ml min^{-1}	1,5, 0,6[a]	
Tiempo de estabilización/s	45, 90[a]	
Número de réplicas	4, 120[a]	
Disposición de medida	axial	
Líneas de Detección	Al	308,215, 394,403, 396,162
	As	180,982, 193,695, 197,202
	Ba	**233,527**, 455,422
	Cd	214,437, 226,508, 228,805
	Cr	205,564, 267,711, 283,563
	Cu	**224,700**, 324,756
	Fe	238,204, 239,574
	Mn	257,610, 259,374, 260,571
	Ni	231,606
	Rb	**420,074**, **780,880**
	Pb	217,000, 220,356, 261,392
	S	**180,669**
	Sb	206,837, 217,582, 231,162
	Sn	189,929
	Sr	**421,560**, 407,790
	V	290, 209, 310
	Zn	202,534, 206,200, 213, 859

[a]= Condiciones de medida en el ICP-OES *on line,* y en negrita líneas de emisión seleccionadas a mayores para dicho método

Dado el no conocimiento acerca del posible efecto matriz en las determinaciones de los contenidos de metales asociados a la fracción MLP-I, la determinación de dichas concentraciones se llevó a cabo empleando la técnica de la adición estándar como método de calibración. Para preparar la recta de adición se inyectó un extracto citosólico varias veces y se recogió la fracción MLP-I juntándose todas ellas en un pool. Cada punto de la recta de adición se preparó con 4 ml de este pool y el correspondiente volumen de patrón multielemental. Los valores de concentración de patrón para cada metal estudiado listan en la **tabla 4.12**.

Tabla 4.12: Concentraciones de patrón multielemental para cada disolución

Patrón Nº	[ ] Patrón/(µg/ml)	Elementos
1	0	Ba, Sr
	0	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn,
	0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
2	0,025	Ba, Sr
	0,25	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn,
	1,25	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
3	0,05	Ba, Sr
	0,5	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn,
	2,5	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
4	0,1	Ba, Sr
	1,0	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn,
	5,0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn

3.5.1.1- OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO

El primer parámetro que se optimizó fue el tiempo estático más adecuado para realizar dicho proceso. El procedimiento a seguir consistió en pesar 5 g de tejido blando de mejillón húmedo y mezclarlos con 2,5 g de tierra de diatomea (agente dispersante). A continuación, se introducen en la celda la cual es situada en el carrusel del equipo de extracción. Los tiempos estudiados fueron 1, 2, 3 y 5 min. Se ha seleccionado como valor máximo 5 min ya que este tiempo es el habitualmente empleado en la bibliografía **[29]**. El programa de extracción seguido es el que se muestra en la **tabla 4.13**.

Tabla 4.13: Programa de preparación del extracto citosólico en PLE para la optimización del tiempo

Disolvente	Temperatura/ºC	Tiempo/min	Presión/psi	Nº Ciclos	Tamaño de Celda/ml
Extractante TRIS-HCl, 2-Mec, NaCl, PMSF	Ambiente (20)	1, 2, 3, 5	1500	2	11

Se realizó cada experimento por duplicado con su correspondiente blanco, llevando los extractos a 25 ml con el extractante. A continuación, y para separar aquellas proteínas con estructura terciaria que pudiesen ser coextraídas, cada extracto se calentó a 60° C durante 15 min y después se centrifugó a 15300 rpm y 4° C durante 30 min. El sobrenadante se enrasó a 25 ml con disolución extractante. El extracto final se filtró y se analizó por duplicado por HPLC registrándose el cromatrograma y recogiéndose la fracción correspondiente a 4,25-7,0 min para llevar a cabo la determinación *off-line*. Estas fracciones se analizan por ICP-OES, calculándose la concentración de metal asociado a la MLP-I empleando la técnica de adición estándar. Los resultados se muestran en la **figura 4.6**, donde puede verse el efecto del tiempo estático sobre la extracción de MLP-I en función del metal ligado a éstas.

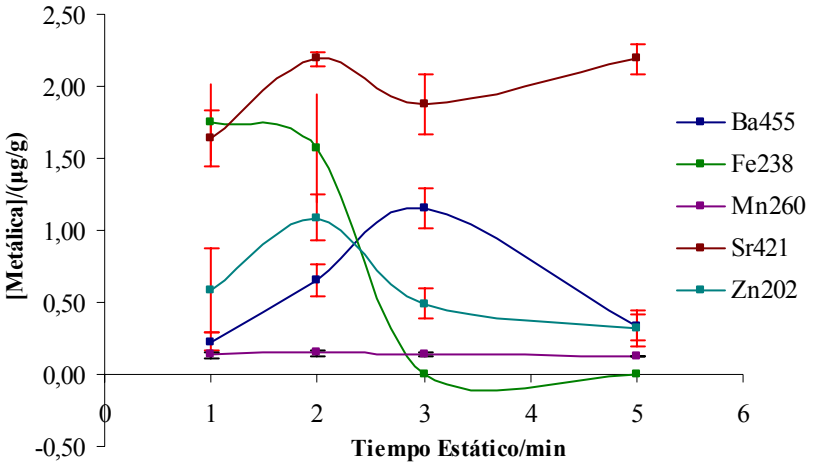


Figura 4.6: Efecto del tiempo estático en la extracción de la MLP-I en función de la concentración de metal ligado a éstas

A la vista de los resultados podemos decir que el valor óptimo de tiempo se encuentra entre 1 y 3 minutos. Escogeremos un tiempo estático de 2 minutos por ser el más adecuado para elementos como el Zn, Sr o Mn que son bastante representativos en las MLPs.

A modo de ejemplo, se muestran algunos cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento *on line,* como los cromatogramas para las líneas del Mn o del Zn (**figuras 4.7** y **4.8** respectivamente). En estas figuras se representa el valor de la señal de emisión correspondiente a cada elemento, no siendo comparable con la concentración de dicho elemento en la fracción recogida y analizada por el método *off line*.

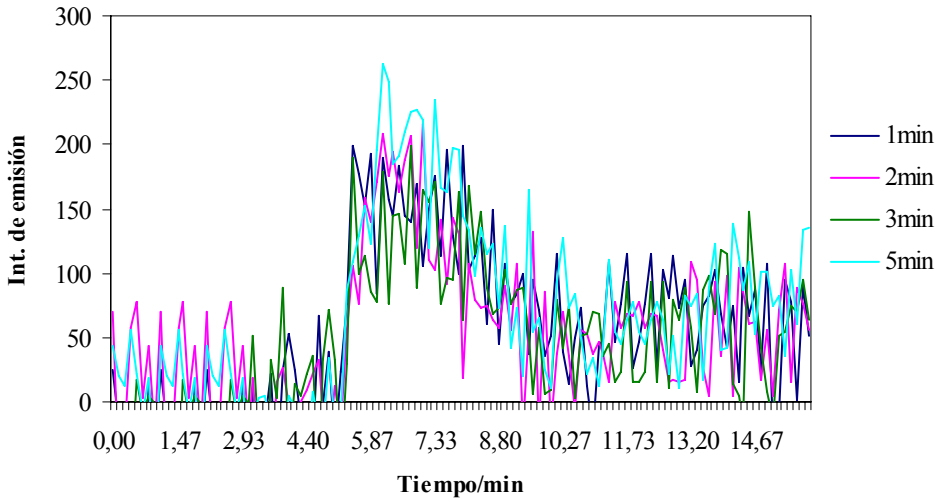


Figura 4.7: Cromatogramas para el Mn en función del tiempo estático

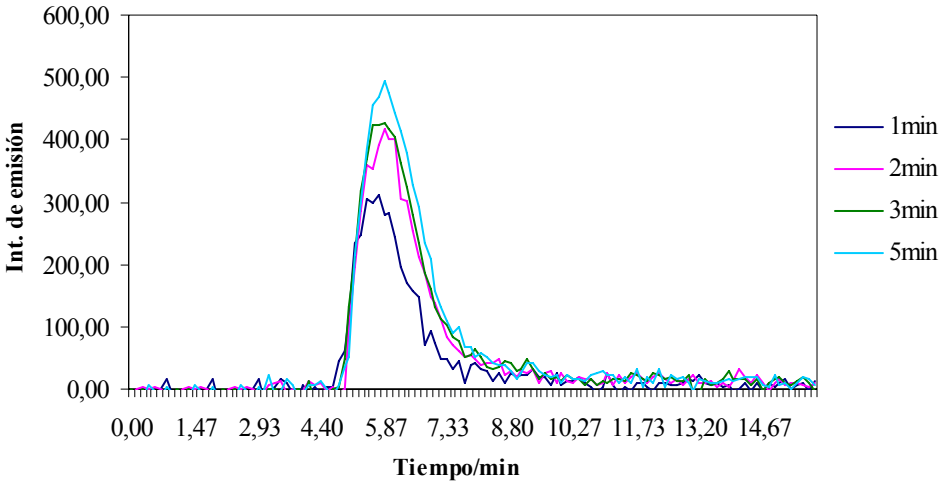


Figura 4.8: Cromatogramas para el Zn en función del tiempo estático

Teniendo en cuenta los resultados de valores óptimos del tiempo estático para cada metal, se tomó como valor de tiempo estático de compromiso 2,0 min.

3.5.1.2- OPTIMIZACIÓN DE LA PRESIÓN

El segundo parámetro que se optimizó fue la presión. En este caso se varió el valor de ésta y se mantuvieron constantes los valores asignados a las restantes variables según se muestra en la **tabla 4.14**. Como ya se comentó al principio, no se probaron valores de presión inferiores a 1500 psi debido a los problemas operacionales de introducción del disolvente en las celdas de extracción cuando se trabaja con muestras de alto contenido proteico.

Tabla 4.14: Programa de preparación del extracto citosólico por PLE en la optimización de la presión

Disolvente	Temperatura/ºC	Tiempo/min	Presión/psi	Nº Ciclos	Tamaño de Celda/ml
Extractante TRIS-HCl, 2-Mec, NaCl, PMSF	Ambiente (20)	2	1500, 2000, 2500, 3000	2	11

Al igual que en la optimización del tiempo de extracción, cada experimento se llevó a cabo por duplicado, haciendo un blanco con cada set de condiciones. Además, el extracto obtenido tras PLE se somete al procedimiento de calentamiento en baño de agua y utracentrifugación descrito con anterioridad, determinando, posteriormente, el contenido de metales asociados a la fracción MLP-I por el método HPLC-ICP-OES *off line*. En la **figura 4.9** se muestra el efecto que la presión ejerce sobre la extracción de las MLPs en función del metal ligado a la isoforma MLP-I.

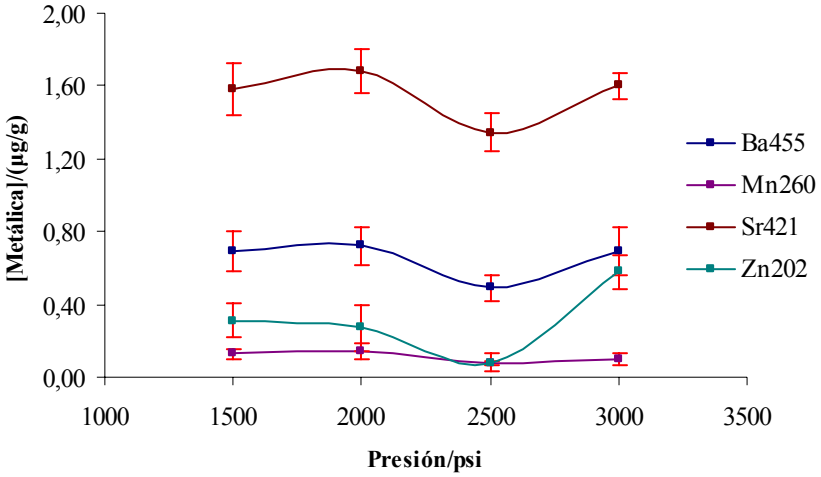


Figura 4.9: Efecto de la presión en la extracción de las MLP-I en función de la concentración de metal ligado a éstas

Observando estos resultados, vemos que la extracción se lleva a cabo de manera exitosa para presiones superiores a 1500 psi; y así, se ha seleccionado presiones comprendidas entre 2000 y 3000 psi como valores de compromiso para ésta.

A modo de ejemplo, las **figuras 4.10** y **4.11** muestran los cromatogramas para Mn y Zn ligado a la fracción MLP-I, respectivamente. Puede verse que se obtiene, igualmente, que la extracción puede llevarse a cabo con presiones de 2000 psi o mayores.

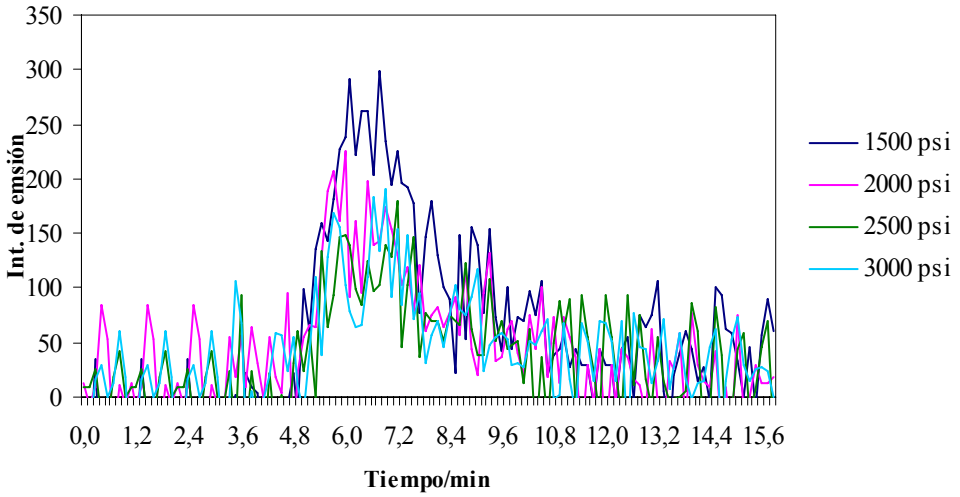


Figura 4.10: Cromatogramas correspondientes al Mn en función de la presión

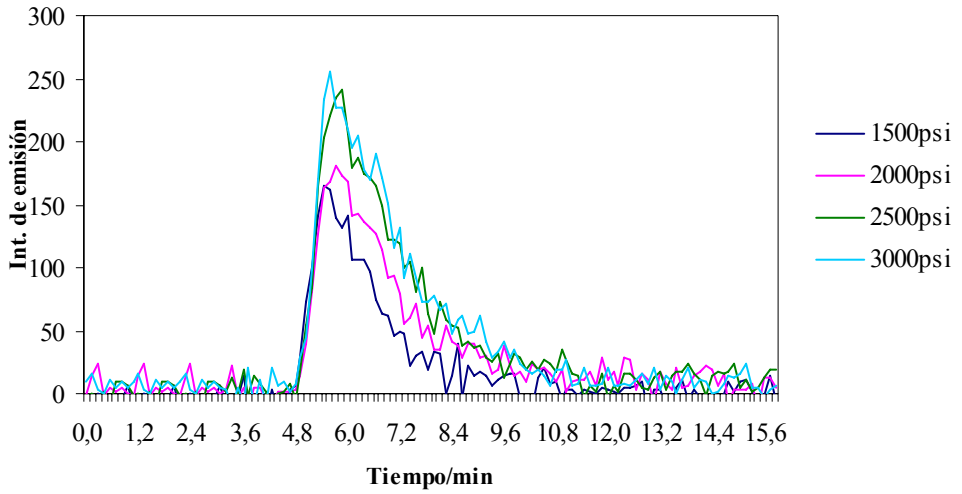


Figura 4.11: Cromatogramas correspondientes al Zn en función de la presión

3.5.1.3- OPTIMIZACIÓN DEL NÚMERO DE CICLOS

El número de ciclos es el tercer parámetro sometido a estudio en el proceso de extracción con PLE. En numerosas publicaciones se pone de manifiesto que es una variable que influye de manera importante en la extracción y por ello es necesaria su optimización. Se varía así, el número de ciclos entre 1, 2, 3 y 4, manteniéndose el resto de las variables constantes según el programa de extracción de la **tabla 4.15**.

Tabla 4.15: Programa de preparación del extracto citosólico por PLE para la optimización del número de ciclos

Disolvente	Temperatura/ºC	Tiempo/min	Presión/psi	Nº Ciclos	Tamaño de Celda/ml
Extractante TRIS-HCl, 2-Mec, NaCl, PMSF	Ambiente (20)	2	2000	1, 2, 3, 4	11

Como en los dos casos anteriores, cada experimento se realizó por duplicado con un blanco, calentando el extracto así obtenido en baño de agua (60 ˚C) y eliminando por

centrifugación las proteínas de estructura terciaria coextraídas. Tras filtración, se cromatografió por duplicado cada extracto y se recogió la fracción entre 4,25 y 7,00 min, la cual se analizó por ICP-OES. La concentración de metal ligado a cada fracción en función del número de ciclos en PLE se muestra en la **figura 4.12**; mientras que en las **figuras 4.13** y **4.14** se representan los cromatogramas obtenidos para el Mn y el Zn al variar el número de ciclos en el proceso de extracción con PLE.

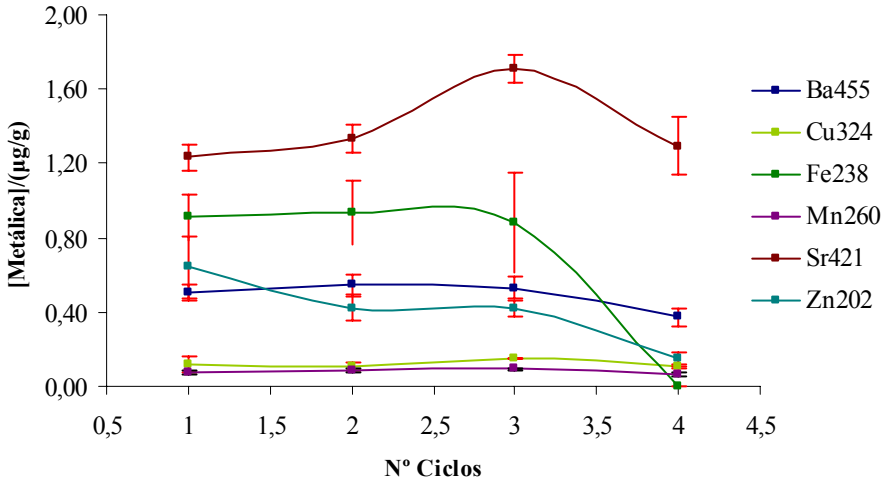


Figura 4.12: Efecto del número de ciclos en la extracción de las MLP-I en función de la concentración de metal ligado

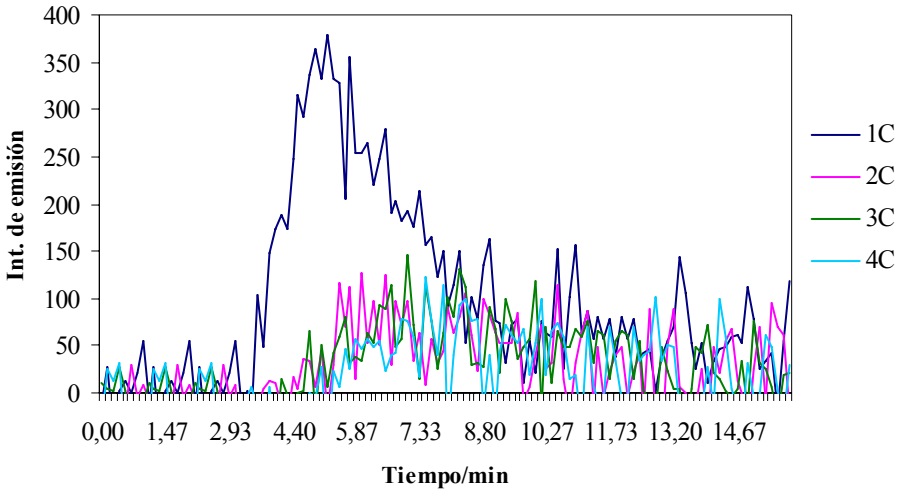


Figura 4.13: Cromatogramas correspondientes al Mn en función del número de ciclos

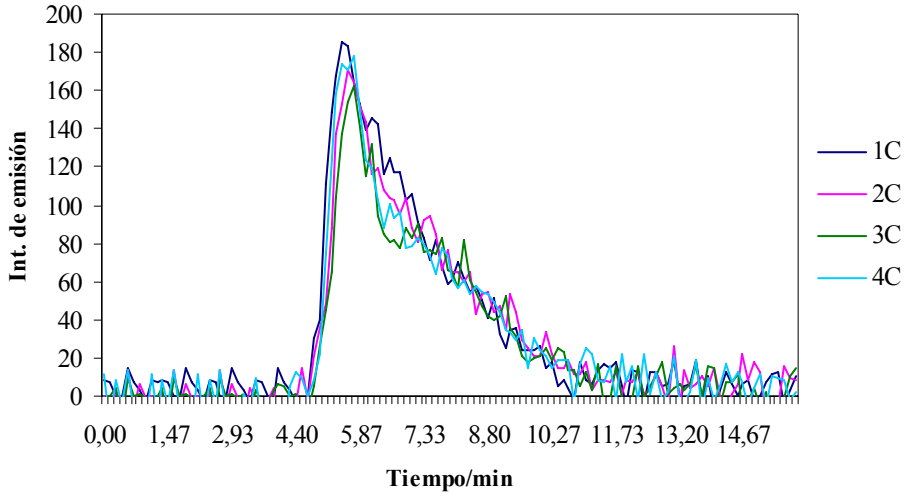


Figura 4.14: Cromatogramas correspondientes al Zn en función del número de ciclos

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la extracción de MLPs puede llevarse a cabo con 1 ciclo, o bien con varios ciclos de extracción, siendo este parámetro poco relevante. Sin embargo, en el caso de la fracción de Mn asociada a la isoforma MLP-I (**figuras 4.12** y **4.13**), se ve que la asociación Mn-MLP-I se rompe a medida que aumenta el número de ciclos o etapas de extracción. Por este motivo, se ha seleccionado como valor óptimo para este parámetro el valor de 1, con la ventaja de que el tiempo de extracción total se ve reducido y con ello todo el proceso de análisis.

3.5.1.4- OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA

El último parámetro que se estudió fue la temperatura de extracción. Es sabido que esta variable es muy importante sobre todo si se trabaja con proteínas debido a la desnaturalización que éstas pueden sufrir. En este apartado se varió la temperatura entre 20 (temperatura ambiente) y 100º C, manteniéndose el resto de variables en su valor ya optimizado. En la **tabla 4.16** se muestran las condiciones de extracción en PLE para la optimización de la temperatura.

Tabla 4.16: Programa de preparación del extracto citosólico por PLE para la optimización de la temperatura

Disolvente	Temperatura/ºC	Tiempo/min	Presión/psi	Nº Ciclos	Tamaño de Celda/ml
Extractante TRIS-HCl, 2-Mec, NaCl, PMSF	20, 40, 50, 60, 70, 80, 100	2	2000	1	11

Al igual que en las anteriores optimizaciones cada experiencia se realizó por duplicado con su correspondiente blanco y se aplicaron de igual modo los métodos HPLC-ICP-OES *on line* y *off line*. Los resultados tras las correspondientes determinaciones se encuentran representados en las **figuras 4.15**, **4.16** y **4.17**.

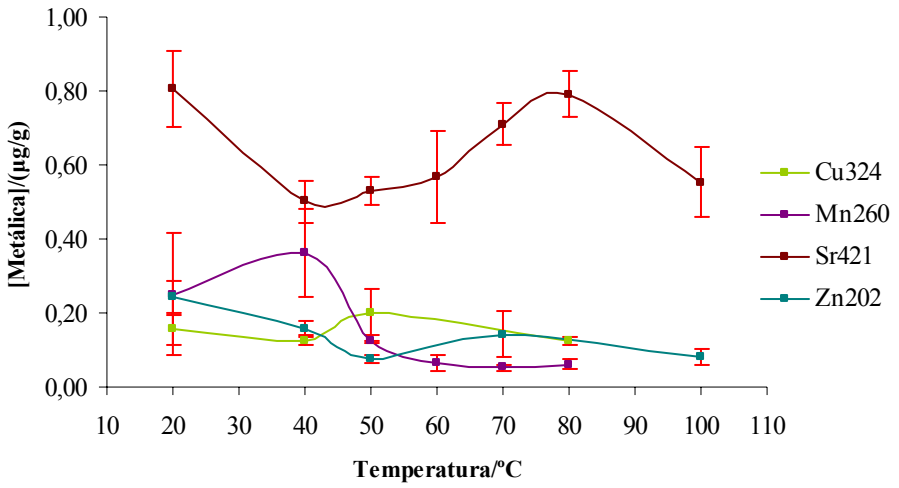


Figura 4.15: Efecto de la temperatura en la extracción de las MLP-I en función de la concentración de metal ligado a éstas

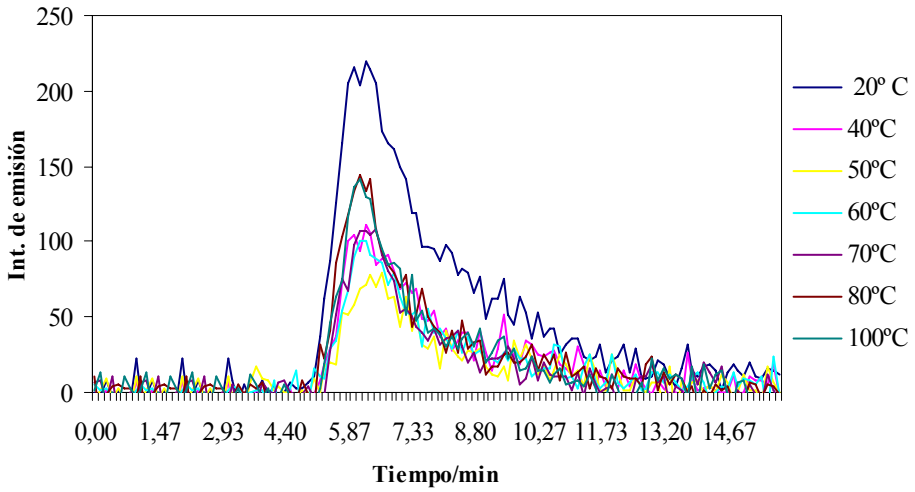


Figura 4.16: Cromatogramas correspondientes al Ba en función de la temperatura

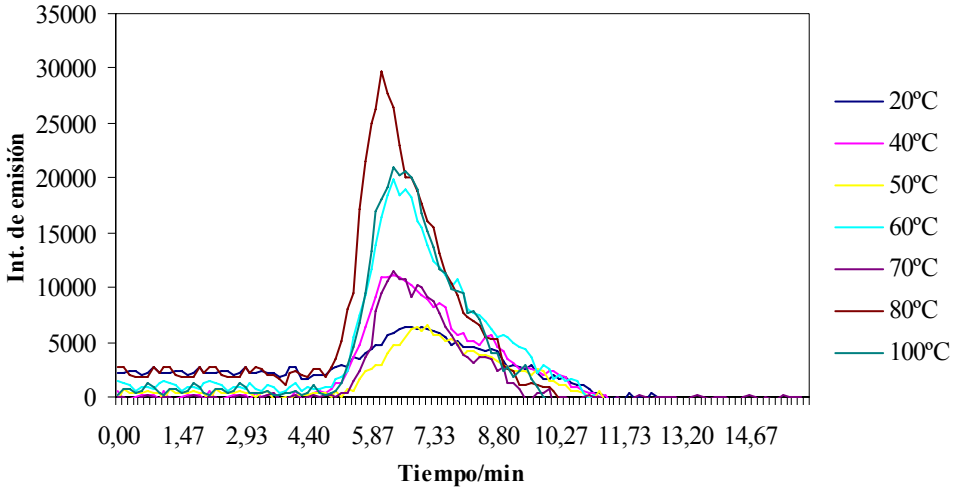


Figura 4.17: Cromatogramas correspondientes al Zn en función de la temperatura

Como en la optimización del número de ciclos se puede observar que el valor de la temperatura no es relevante, si bien para elementos mayoritarios como el Zn, Cu o Sr las temperaturas óptimas son las temperaturas bajas. Esto indica que la ruptura metal-proteína, especialmente para el Zn, se produce a temperaturas no muy elevadas, lo cual está en relación a la ruptura de los enlaces Zn-MTs por efecto térmico referida por diversos autores **[7]**. Para la fracción de Ba ligada a MLPs se observa que los valores de temperaturas óptimos son mayores que

la temperatura ambiente. Esto puede ser debido a fenómenos de contaminación por parte de las celdas de extracción para este metal, tal y como se verá en las secciones siguientes. Así, se ha seleccionado como temperatura óptima de trabajo la temperatura ambiente (18–20º C). El empleo de temperatura ambiente durante la extracción lleva consigo una ventaja adicional en el sentido de que no es necesario un tiempo de calentamiento previo de la muestra dispersada y el disolvente en el interior de la celda, tiempo que, habitualmente y en función de la temperatura fijada, puede llegar a ser de 10 min. Por lo tanto, el empleo de temperatura ambiente en la preparación del extracto citosólico supone un tiempo de extracción de 2,0 min, siendo el tiempo total de preparación, teniendo en cuenta la purga del disolvente, de aproximadamente 3,0 min.

*3.5.2- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO ASISTIDO POR PLE Y DETERMINACIÓN DE LOS METALES LIGADOS A LA FRACCIÓN **MLP-I** POR HPLC-ICP-OES*

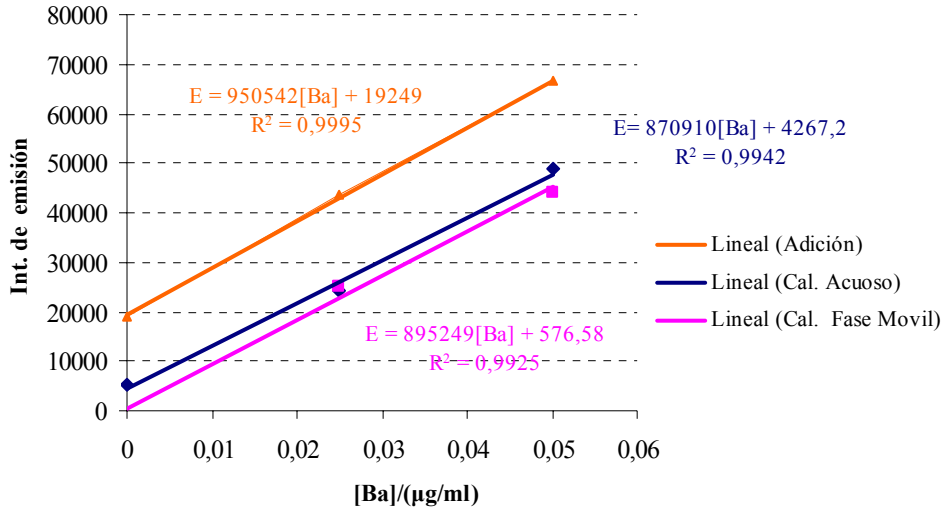
Una vez optimizado el método de extracción de MLP-I asistido por PLE, se procedió al estudio de las características analíticas del método, concretamente linealidad, estudio del efecto matriz, LOD, LOQ y precisión. Para ello se utilizaron las definiciones y fórmulas correspondientes ya citadas anteriormente (Capítulo I, **ecuaciones 1.4**, **1.5** y **1.6**)

3.5.2.1- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD Y DEL EFECTO MATRIZ

Para el estudio de la linealidad y del efecto matriz se prepararon tres curvas, una de calibrado acuoso, otra de calibrado en fase móvil, esto es en disolución reguladora TRIS-HCl 75,0-75,0 mM y pH 7,4, y por último una recta de adición estándar. Las concentraciones de patrón multielemental son las mostradas en la **tabla 4.12** y el procedimiento para la realización de la curva de adición es el descrito anteriormente. En cuanto a las condiciones de trabajo tanto en HPLC, para la obtención de la fracción de MLP-I necesaria para la obtención de la recta de adición, como en ICP-OES, éstas están recogidas en las **tablas 4.10** y **4.11**.

Como puede verse en las **figuras 4.18** a **4.21**, y después de aplicar distintos tests estadísticos de comparación de medias y desviaciones estándar de las pendientes de dichas rectas, se concluye que en la determinación de los elementos mayoritarios asociados a la fracción MLP-I

no existe efecto matriz ya que no hay diferencia significativa, al 95%, entre las pendientes de la rectas de calibrado acuoso, en fase móvil y la de adición estándar.



Figuras 4.18: Estudio de la linealidad y del efecto matriz para el Ba

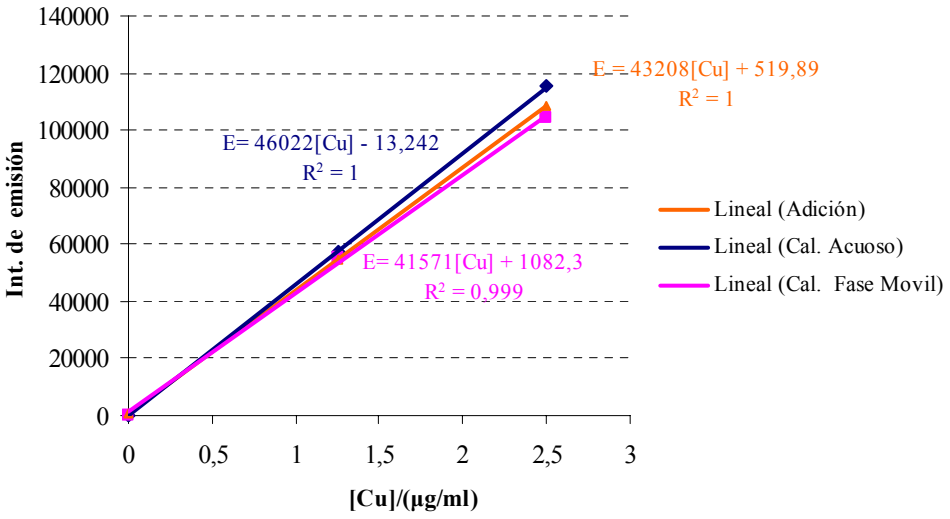


Figura 4.19: Estudio de la linealidad y del efecto matriz para Cu

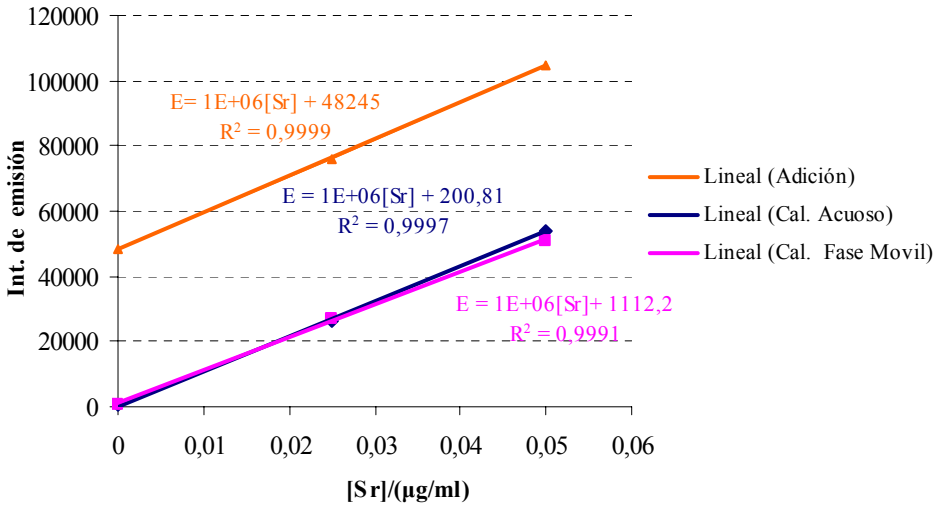


Figura 4.20: Estudio de la linealidad y del efecto matriz para el Sr

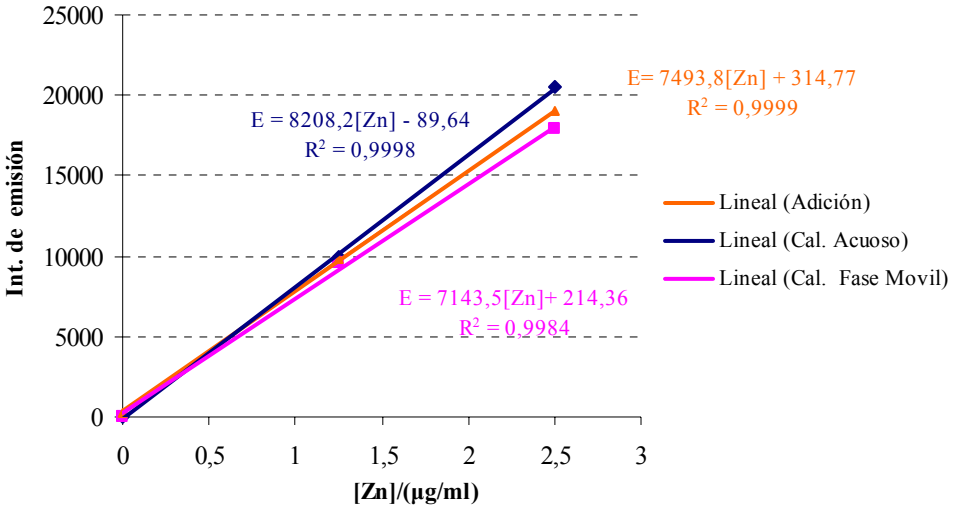


Figura 4.21: Estudio de la linealidad y del efecto matriz para el Zn

Los valores medios de las pendientes de las curvas de calibrado acuoso, en fase móvil y adición estándar para cada elemento se recogen en la **tabla 4.17**.

Tabla 4.17: Pendientes de las rectas de calibrado acuoso, calibrado en fase móvil y adición expresadas como media±sd para n=2

Elemento	Calibrado Acuoso/(ml/µg)	Calibrado en Fase Móvil/(ml/µg)	Adición/(ml/µg)
Al 308	4117,5±371,4	4102,8±127,3	4195,5±392,9
Ba 455	777585,5±131980,8	812076±117624	843943,5±150753
Cu 324	42313,5±5244,6	41055,5±729,0	40972±3162
Fe 238	12257,6±1378,2	11546,5±440,5	11709±1015
Mn 260	79086±9748	74460,5±3563,1	75684±7237
Sr 421	909991,5±127291,2	924274±107093	933809,5±93608,0
Zn 202	7777,6±608,9	7155,5±184,0	7176,6±448,7

3.5.2.2- ESTUDIO DEL LOD Y LOQ

Para el cálculo del LOD y del LOQ se procedió a la medida por ICP-OES de un blanco de reactivo consistente en la disolución extractante sometida al proceso óptimo de PLE y cromatografiado distintas veces para aislar la fracción que correspondería a las MLP-I. Se llevaron a cabo once determinaciones distintas sobre dicho blanco. Los resultados de LOD y LOQ para los diferentes elementos, una vez tenida en cuenta la dilución y referidos a la masa de mejillón húmedo, se muestran en las **tablas 4.18** y **4.19**.

Tabla 4.18: Valores de LOD para los distintos elementos medidos

Elemento	LOD/(µg/g)	Elemento	LOD/(µg/g)
Al	1,07	***Mn***	0,05
Ba	0,22	***Sr***	0,03
Cu	0,13	***Zn***	0,07
Fe	1,15	-	

Tabla 4.19: Valores de LOQ para los distintos elementos medidos

Elemento	LOQ/(µg/g)	Elemento	LOQ/(µg/g)
Al	3,55	***Mn***	0,18
Ba	0,73	***Sr***	0,06
Cu	0,43	***Zn***	0,24
Fe	3,85	-	

3.5.2.3- ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

Para el cálculo de la precisión se sometió una muestra de mejillón al procedimiento de preparación del extracto citosólico asistido por PLE once veces. Tras separación cromatográfica y análisis de la fracción correspondiente a la MLP-I (tiempos entre 4,25 y 7,00 min) por ICP-OES empleando un calibrado acuoso, se calcularon las concentraciones medias de los metales asociados a dicha fracción proteica, las desviaciones estándar de dichas medias y el coeficiente de variación. De esta forma, la precisión total del procedimiento se recoge en la **tabla 4.20**.

Tabla 4.20: Resultados de precisión para los diferentes elementos ligados a las MLP-I tras la extracción de éstas con PLE

Elemento	CV/%	Nº de extractos	Elemento	CV/%	Nº de extractos
Ba	28	10	***Mn***	23	8
Cu	35	9	***Sr***	24	11
Fe	20	6	***Zn***	21	9

Como se puede observar, los resultados se encuentran en torno al 20%. Dichos valores se consideran adecuados dada la baja concentración de los metales ligados a MLPs y al laborioso procedimiento de extracción, separación y determinación.

3.5.3- PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO ASISTIDO POR PLE

Después de la optimización del método de preparación del extracto citosólico asistido por PLE, éste se puede resumir como sigue:

1. Se pesan 5 g de mejillón húmedo y se mezclan con 2,5 g de tierra de diatomeas en un mortero de ágata. La mezcla se introduce en la celda de extracción entre dos filtros de celulosa.
2. Se realiza la extracción PLE a 2000 psi, 20º C durante 2 min y 1 ciclo, usando como disolvente TRIS-HCl 75,0-75,0 mM y pH 7,4.
3. Se enrasa el extracto a 25 ml con el disolvente TRIS-HCl 75,0-75,0 mM y pH 7,4.
4. El extracto se calienta en baño de agua a 60º C durante 15 min.

5. Centrifugación a 15300 rpm y 4º C durante 30 min y enrase a 25 ml con la disolución reguladora TRIS-HCl 75,0-75,0 mM.

3.6- COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CITOSÓLICO DE MEJILLÓN POR PERCUSIÓN Y PLE

Una vez optimizados los métodos de preparación del extracto citosólico de mejillón mediante el procedimiento de percusión (Stomacher) y por extracción con líquidos presurizados (PLE), se aplicaron ambos procedimientos a 14 muestras de mejillón pertenecientes a la campaña de muestreo de febrero de 2002 llevado a cabo en la Ría de Arousa. Cada muestra se preparó por triplicado, filtrando los extractos y sometiendo éstos al proceso de determinación por HPLC-ICP-OES *off line* (**tablas 4.10** y **4.11**).

Los resultados expresados en función de la media y la desviación estándar de las medidas se recogen en la **tabla 4.21**, para los resultados obtenidos cuando el extracto se prepara por PLE, y en la **tabla 4.22** si éste se prepara mediante percusión (Stomacher).

Tabla 4.21: Concentraciones de las fracciones de Ba, Cu, Mn, Sr y Zn asociado a MLP-I en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002): preparación del extracto citosólico asistido por PLE

Muestra Nº	[Ba]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Sr]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	0,36±0,05	0,13±0,03	0,11±0,02	0,79±0,06	0,10±0,01
11	0,63±0,04	No Detectado	0,20±0,03	0,97±0,04	0,25±0,05
12	0,06±0,14	No Detectado	0,07±0,01	0,60±0,03	0,76±0,04
13	0,59±0,03	No Detectado	0,07±0,01	1,09±0,05	0,89±0,11
14	0,41±0,08	No Detectado	0,10±0,01	0,73±0,05	0,29±0,05
15	0,46±0,03	0,14±0,04	0,09±0,02	0,79±0,02	0,41±0,05
16	0,42±0,11	No Detectado	0,09±0,02	0,64±0,13	0,32±0,06
18	0,76±0,16	No Detectado	0,07±0,01	0,84±0,11	0,45±0,07
19	0,54±0,05	No Detectado	0,10±0,01	0,88±0,05	1,02±0,09
20	0,68±0,09	No Detectado	No Detectado	0,72±0,07	0,17±0,01
22	0,47±0,06	0,15±0,03	No Detectado	0,80±0,02	0,50±0,05
23	0,66±0,17	0,17±0,05	0,11±0,02	1,72±0,26	0,81±0,19
29	0,61±0,06	0,15±0,02	0,11±0,03	1,08±0,11	0,43±0,08
30	0,79±0,06	0,13±0,03	0,07±0,01	1,09±0,06	0,46±0,08

Tabla 4.22: Concentraciones de las fracciones de Ba, Cu, Mn, Sr y Zn asociado a MLP-I en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002): preparación del extracto citosólico por percusión (Stomacher)

Muestra Nº	[Ba]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Sr]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	0,02±0,01	0,18±0,04	0,10±0,01	1,32±0,06	No Detectado
11	0,09±0,03	0,16±0,02	0,22±0,05	1,00±0,12	0,81±0,13
12	0,03±0,008	No Detectado	0,08±0,02	0,57±0,12	0,85±0,12
13	0,02±0,007	0,10±0,02	0,09±0,01	1,02±0,13	0,31±0,02
14	0,08±0,02	No Detectado	0,21±0,02	0,95±0,08	0,25±0,04
15	0,04±0,01	0,12±0,02	0,06±0,01	0,86±0,11	0,15±0,03
16	0,01±0,004	0,14±0,02	0,23±0,04	1,30±0,18	0,62±0,09
18	No Detectado	0,18±0,02	0,10±0,02	0,80±0,11	No Detectado
19	0,05±0,01	0,18±0,03	0,16±0,06	0,93±0,06	0,18±0,03
20	No Detectado	0,17±0,05	0,10±0,02	1,09±0,06	1,62±0,42
22	No Detectado	0,12±0,02	0,04±0,01	1,09±0,14	No Detectado
23	0,02±0,001	0,15±0,01	0,08±0,02	1,46±0,17	0,63±0,06
29	0,043±0,01	No Detectado	0,08±0,01	0,97±0,08	No Detectado
30	0,03±0,01	0,13±0,04	0,06±0,01	1,06±0,09	0,61±0,10

Para ver si ambos métodos de preparación del extracto citosólico de mejillón eran comparables, se aplicó a los resultados mostrados en las **tablas 4.21** y **4.22** un test de pares de valores. La comparación se basa en calcular las diferencias entre los pares de valores y comprobar si la media de las diferencias obtenidas al aplicar ambos métodos es significativamente igual o diferente de cero. Para ello se plantean dos hipótesis, si se cumple la hipótesis nula significa que con ambos métodos se obtienen los mismos resultados, mientras que si se cumple la hipótesis alternativa indica que existe diferencia entre los datos obtenidos por los dos métodos. A continuación se aplica el test t a la distribución de las diferencias, de modo que se obtiene la t experimental que se compara con la t tabulada para n-1 grados de libertad y 0,05% de nivel de significación. Los resultados de t experimental y t tabulada para cada elemento determinado se muestran en la **tabla 4.23**.

Tabla 4.23: Valores de t experimental y t tabulada para cada elemento para un nivel de significación de 0,05%

	Ba	Cu	Mn	Sr	Zn
t_{ex}	4,61	0,08	-0,35	-0,90	-0,27
t_{tab}	2,23	2,78	2,2	2,16	2,26

Podemos decir que ambos métodos son comparables en cuanto a la determinación de las fracciones de Cu, Mn, Sr y Zn ligados a la isoforma MLP-I, pero no así si nos referimos a la determinación de Ba-MLP-I, ya que la t experimental es mayor que la t tabulada. Este hecho podría deberse a una contaminación parcial por Ba de los extractos obtenidos por PLE, tal y como se ha encontrado en otras aplicaciones de esta técnica en la extracción de metales **[41, 42]**.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han optimizado dos métodos sencillos y novedosos para llevar a cabo la preparación del extracto citosólico de mejillón. El primer método emplea un sistema de percusión (Stomacher) como sistema de homogeneización entre la muestra y el extractante, y el segundo emplea el procedimiento de extracción líquida presurizada (PLE). Ambos procedimientos son rápidos, especialmente el procedimiento asistido por PLE, lo que se traduce en una eficiente preparación del extracto citosólico. Por otra parte, el método asistido por PLE elimina el primer paso de centrifugación entre la muestra y el extracto citosólico ya que el tejido de mejillón queda retenido en la celda de extracción.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] R. Łobiński, H. Chassaigne, J. Szpunar, *"Analysis for metallothioneins using coupled techniques"*. Talanta, 1998 46, 271-289.

[2] J. Szpunar, R. Łobiński, *"Species-selective analysis for metal biomacromolecular complexes using hyphenated techniques"*. Pure and Applied Chemistry, 1999, 71, 899-918.

[3] K. A. High, B. A. Methven, J. W. McLaren, K. W. M. Siu, J. Wang, J. F. Klaverkamp, J. S. Blais, *"Physico-chemical characterization of metal binding proteins using HPLC-ICP-MS, HPLC-MA-AAS and electrospray-MS"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1995, 351, 393-402.

[4] K. A. High, J. S. Blais, B. A. J. Methven, J. W. McLaren, *"Probing the characteristics of metal-binding proteins using high-performance liquid chromatography-atomic absorption spectroscopy andiInductively coupled plasma mass spectrometry"*. Analyst, 1995 120, 629-634.

[5] K. A. High, V. J. Barthet, J. W. McLaren, J.S. Blais, "*Characterization of metallotionein-like proteins from Zebra mussels (Dreissena Polymorpha)"*. Environmental and Toxicology Chemistry, 1997, 16, 1111-1118.

[6] G. Roesijadi, B. A. Fowler, *"Purification of invertebrate metallotioneins"*. Methods in Enzimology, 1991, 205, 263-271.

[7] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, *"Quantification of metal distribution in metallotioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP-AES"*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000, 368, 839-843.

[8] H. M. Crews, J. R. Dean, L. Ebdon, R. C. Massey, *"Application of high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of cadmium speciation in pig kidney following cooking and in vitro gastro-intestinal digestion"*. Analyst, 1989, 114, 895-899.

[9] H. Goenaga Infante, M. L. Fernádez Sánchez, A. Sanz Medel, *"Vesicle-mediated high performance liquid chromatography coupled to hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry for cadmium sopeciation in fish cytosols"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 519-524.

[10] O. Nieto, G. Hellemans, G. Bordin, M. De Ley, A. R. Rodríguez, *"Characterization of human foetal liver Zn-metalothioneins using differential pulse polarography"*. Talanta, 1998, 45, 315-324.

[11] K. M. Y. Leung, R. E. Dewhurst, H. Halldórsson, J. Svavarsson, *"Metallothioneins and trace metals in the dogwhelk Nucella lapillus (L.) collected from Icelandic coasts"*. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51, 729-737.

[12] T. Minami, C. Yoshita, M. Tanaka, K. Kubo,, N. Okabe, Y. Okazaki, *"Separation of metallotionein isoforms of mouse liver cytosol by capillary zone electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 347-354.

[13] P. Irato, G. Santovito, A, Cassini, E. Piccinni, V. Albergoni, *"Metal accumulation and binding protein induction in mytilus galloprovincialis, scapharca inaequivalvis, and tapes philippinarum from the Lagoon of Venice"*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 44, 476-484.

[14] B. Raspor, Z. Dragun, M. Erk, D. Ivankovic, J. Pavicic, *"Is the digestive gland of Mytilus galloprovincialis a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins?"*. Science of the Total Environment, 2004, 333, 99-108.

[15] Z. Dragun, M. Erk, B. Raspor, D. Ivankovic, J. Pavicic. *"Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels Mytilus galloprovincialis Lmk"*. Environmental International, 2004, 30, 1019-1025.

[16] S. Miyairi, S. Shibata, A. Naganuma, *"Determination of Metallothioneins by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system"*. Analytical Biochemestry, 1998, 258, 168-175.

[17] S. G. George, *"Heavy metal detoxification in the mussel Mytilus edulis-composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes)"*. Comprenshive Biochemistry.Physiology, 1983, 76C, 53-57.

[18] J. Muñoz, J. R. Baena, M. Gallego, M. Varcárcel, *"Development of a method for the determination of inorganic cadmiun metallothioneins in fish liver by continuous preconcentration on fullerene and flame atomic absorption spectrometry"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17, 716-720.

[19] C. B. Knudsen, J. H. Beattie, *"On-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis for enhanced detection sensitivity and selectivity: application to the analysis of metallothioneins isoforms in sheep fetal liver"*. Journal of Chromatography A, 1997, 792, 463-473.

[20] C. Ferrarelo, M. R. Fernández de la Campa, H. Goenaga Infante, M .L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel, *"Improved separation of rabbit liver metallothioneins by FPLC-ICP-MS: a comparison with the conventional anion-exchange chromatography"*. Analusis, 2000, 28, 351-357.

[21] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, C. Sariego Muñiz, A. Sanz Medel, *"Metal distribution patterns in the mussel Mytilus edulis cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection"*. Analyst, 2000, 125, 2223-2229.

[22] C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco, A. Sanz Medel, *"Speciation of*

metallothionein-like proteins of the mussel Myttilus edulis by ortogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration". Spectrochimica Acta Part B, 2002, 57, 439-449.

[23] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, M. M. Bayón, A. Sanz Medel, *"Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallotionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time-of-fligth mass spectrometric detection"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1558-1563.

[24] C. N. Ferrarello, M. Fernández de la Campa, J. Carrrasco, A. Sanz Medel, *"Speciation of metallotionein-like proteins of the mussel mytilus edulis at basal levels by chromatographic separations coupled to quadruple and double-focusing magnetic sector ICPMS"*. Analytical Chemistry, 2000, 72, 5874-5880.

[25] G. Álvarez Llamas, M. R, Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, *"Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 460-466.

[26] C. Camel, *"Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls"*. Analyst, 2001, 126, 1182-1993.

[27] H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namiesnik, *"Accelerated solvent extraction (ase) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory and practice"*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2001, 31, 149-165.

[28] R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, P. Revilla Ruiz, J. Hernández Méndez, *"Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples"*. Journal of Cromatography A, 2005, 1089, 1-17.

[29] E. Bjorklund, T. Nilsson, *"Pressurized liquid extraction of persistent organic pollutans in environmental analysis"*. Trends in Analytical Chemistry, 2000, 19, 434-445.

[30] J. Luque García, M. D. Luque de Castro, *"Coupling of pressurized liquid extraction to other steps in environmental analysis"*. Trends in Analytical Chemistry, 2004, 23, 102-108.

[31] E. Alonso Rodríguez, J. Moreda Piñeiro, P. López Mahía, D. Prada Rodríguez, E. Fernández Fernández, S. Muniategui Lorenzo, A. Moreda Piñeiro, A. Bermejo Barrera, P. Bermejo Barrera. *"Pressurized liquid extraction of organometals and its feasibility for total metal extration"*. Trends in Analytical Chemistry, 2005, 25, 511-519.

[32] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzel, N. L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, *"Accelerated solvent extraction: a techinique for sample preparation"*. Analytical Chemistry, 1996, 68, 1033-1039.

[33] M. Herrero, P. J. Martín Álvarez, F. J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *"Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from Spirulina platensis microalga"*. Food Chemistry, 2005, 93, 417-423.

[34] W. Jira, *"A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes"*. European Food Research and Technology, 2004, 218, 208-212.

[35] M. A. Olivella, *"Trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter by accelerated solvent extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry"*. Analytical Bionalytical Chemistry, 2005, 383, 107-114.

[36] V. Yusa, O. Pardo, P. Martí, A. Pastor, *"Aplication of accelerated solvent extraction followed by gel performance chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue"*. Food Additives and Contaminants, 2005, 22, 482-489.

[37] S. Sporing, E. Bjorklund, *"Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples. Influence of cells dimensions, solvent type, temperature and flush volume"*. Journal of Chromatography A, 2004, 1004, 155-161.

[38] A. Muller, E. Bjorklund, C. von Holst, *"On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry"*. Journal of Chromatography A, 2001, 925, 197-205.

[39] M Nording, S. Sporring, K. Wiberg, E. Bjorklund, P. Haglund, *"Monitoring dioxins in food and feedstuffs using accelerated solvent extraction with a novel integrated carbon fractionation cell in combination with a CAFLUX bioassay"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381, 1472-1475.

[40] Y. Ashizuka, R. Nakagawa, K. Tobiishi, T. Hori, T. Iida, *"Determination of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans in marine products"*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 3807-3813.

[41] J. Moreda Piñeiro, E. Alonso Rodríguez, P. López Mahía, S. Muniategui Alonso, E. Fernández Fernández, D. Prada Rodríguez, A. Moreda Piñeiro, P. Bermejo Barrera, A. Bermejo Barrera, *"Pressurized liquid extraction as a novel sample pre-treatment for trace element leaching from biological material"*. Analytica Chimica Acta, 2006, 572, 172-179.

[42] A. Moreda Piñeiro, P. Bermejo Barrera, A. Bermejo Barrera, J. Moreda Piñeiro, E. Alonso Rodríguez, S. Muniategui Alonso, P. López Mahía, D. Prada Rodríguez, *"Feasibility of pressurizaticen to speed up enzymatic hydrolysis of biological materials for multi-element determinations"*. Analytical Chemistry, 2007, en prensa

CAPÍTULO V

ESTUDIO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN DE MLPS

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN 311
1.1- Estudio de la preconcentración de las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** en extractos citosólicos de mejillón 313
II- OBJETIVO 319
III- PARTE EXPERIMENTAL 323
3.1- Reactivos 325
3.2- Material 326
3.3- Limpieza del material 328
3.4- Preconcentración por SPE de las isoformas **MLP-I** y **MLP-II** con soportes de C_{18} 329
3.4.1- Ensayos con cartuchos comerciales de C_{18} 329
3.4.2- Ensayos preliminares con columnas de C_{18} 334
3.4.3- Optimización del proceso de preconcentración de MLPs de mejillón por extracción en fase sólida con soportes de C_{18} 336
3.4.3.1- Optimización de las condiciones de separación cromatográficas 336
3.4.3.2- Optimización del proceso de carga 339
3.4.3.3- Optimización del proceso de elución 347
3.4.3.4- Acoplamiento HPLC-ICP-OES 357
3.5- Estudio de la preconcentración de MLPs de mejillón por ultrafiltración por exclusión de tamaños 360
3.5.1- Estudios previos 362
3.5.1.1- Estudios sobre la reutilización de los tubos de ultrafiltración 363
3.5.1.2- Estudios sobre el efecto de la velocidad de centrifugación 369
3.6- Estudio de la preconcentración de MLPs de mejillón por liofilización 374
3.6.1- Optimización de las condiciones cromatográficas en la separación preparativa de MLPS en preconcentrados citosólicos de mejillón 377
3.6.2- Estudio de la linealidad, efecto matriz, LOD y LOQ del método para preconcentrados citosólicos de mejillón por HPLC-ICP-OES *off line* 380
3.6.3- Estudio de la precisión del método para preconcentrados citosólicos de mejillón por HPLC-ICP-OES *off line* 384
3.6.4- Estudio de la precisión del método para preconcentrados citosólicos de mejillón por

HPLC-ICP-OES *on line* 385
IV- CONCLUSIONES 387
V- BIBLIOGRAFÍA 391

INTRODUCCIÓN

*1.1- ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN DE LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN*

Tras el estudio de especiación de las dos isoformas de MLP presentes en el mejillón, y de la concentración metálica asociada a cada una de ellas, se llega a la conclusión de que aunque la isoforma MLP-I se logra separar y detectar en la mayoría de las ocasiones sin ningún problema, no ocurre lo mismo con la isoforma MLP-II. Por otro lado, cabe destacar que hay muchos metales de gran importancia toxicológica, como puede ser el caso del Cd, cuya presencia en las MTs es ampliamente conocida, que no se logran detectar en ninguna de las isoformas. Por todo lo anteriormente comentado es necesario realizar un estudio de preconcentración para ver si se logra detectar, por un lado, la isoforma MLP-II, y por otro lado elementos importantes como el Cd asociados a cada isoforma.

Como ya se ha comentado en el Capítulo III, una de las técnicas más empleadas en la separación de proteínas es la electroforesis capilar (CE). Existen trabajos en el que se exponen diferentes métodos de preconcentración, debido a los pobres LOD y sensibilidad que presenta la CE, en gran parte relacionados con la pequeña cantidad de muestra que se puede introducir en el sistema. Las técnicas de preconcentración propuestas se dividen en dos clases. Esta clasificación se basa en el fenómeno físico usado para preconcentrar los analitos. En el primer grupo tenemos aquellas técnicas que se basan en la modificación de la velocidad electroforética, y en el segundo las técnicas basadas en la partición dentro de la fase estacionaria o pseudoestacionaria (cromatografía de preconcentración) **[1, 2]**. Esta última se divide a su vez en cromatografía de preconcentración de baja y alta especificidad. En la de baja especificidad se encuentran las técnicas basadas en la cromatografía de fase de adsorción sólida, como la extracción en fase sólida (SPE) y la preconcentración con membranas (mPC, *membrane Preconcentration*), o técnicas basadas en la cromatografía de distribución en la fase líquida, como la electroextracción (EE, *Electroextraction*) o los soportes de membrana líquida (SLM, *Supported Liquid Membrane*), así como las técnicas basadas en las fibras huecas. En cuanto a las de alta especificidad tenemos la cromatografía de inmunoafinidad y las técnicas de impresión molecular **[2]**.

Cabe destacar la utilización de las fibras huecas. Esta técnica se basa en el transporte de agua a través de los poros de una fibra en la cual la adsorción del soluto va a ser insignificante. El transporte del agua se puede llevar a cabo de modo pasivo, activo, o mediante el denominado efecto *Donnan*, sumergiendo la fibra llena con la muestra en una disolución de un polímero. Este

método presenta la ventaja de que preconcentra todas las sustancias independientemente de su peso molecular. *Zhang et al.* **[3]** proponen diferentes configuraciones del sistema, concretamente cuatro. En la primera, la concentración se lleva a cabo por evaporación en una fibra abierta en los extremos, por lo que el concentrado se localiza en el medio de ésta. En la segunda, también se lleva a acabo mediante evaporación, pero en este caso uno de los extremos de la fibra está cerrado, con lo que el concentrado se localizada al final de la fibra. La tercera se basa en la concentración mediante el efecto *Donnan*, estando uno de los extremos de la fibra cerrado. En la cuarta, donde la preconcentración es por evaporación, uno de los extremos de la fibra está cerrado y parte de ésta está sumergida en la disolución del polímero. El método se aplicó a una serie de proteínas estándar y se observó que se obtiene una recuperación del 100% y buenos enriquecimientos y factores de preconcentración. En otros trabajos en los que se utiliza las fibras huecas, se emplea la misma disolución reguladora en el proceso de inyección o concentración que en el de separación, viéndose que el factor de preconcentración es mayor a medida que aumenta el tiempo de concentración y la movilidad electroforética de las proteínas **[4]**.

La extracción en fase sólida (SPE), basada en la cromatografía en fase reversa y que se emplea como pretratamiento de la muestra en separaciones, permite la introducción de una gran cantidad de muestra de baja concentración dentro de la fase sólida y la elución de los analitos con un volumen pequeño de eluyente, de modo que se obtienen concentraciones que son fácilmente detectables **[1]**. Por lo general, las fases estacionarias suelen ser de tipo polimérico como el estireno-divinil-benceno, C_2, C_4, C_8 o C_{18} **[1, 2]**. Podemos decir que el polímero más utilizado es la C_{18} y el modo de trabajo tanto de forma *on line* como *off line*. La técnica SPE con soporte de C_{18} se ha empleado en la preconcentración de proteínas, como por ejemplo los procedimientos desarrollados por *Bonneil et al.* **[5]** para ß–caseínas defosforiladas de origen bovino, o los atribuidos a *Strausbauch et. al* **[6]** y *Tomlinson* **[7]** para péptidos. Los resultados indican que una de las limitaciones del uso de SPE para preconcentrar proteínas es que reduce la capacidad de separación de éstas cuando se emplea la CE como técnica de separación.

Otros métodos de preconcentración de proteínas por SPE son aquellos que emplean como soporte una resina cambiadora de iones, concretamente los soportes de intercambio catiónico fuerte (SCX, *Strong Cation Exchange*), que se aplica sobre el digerido en gel de proteínas, previo al análisis mediante HPLC-ESI-MS **[8]**. También se ha utilizado la cromatografía de cambio iónico de capa fina empleando ácido fítico como desplazador en la purificación y concentración de a ß-lactoglobulina (A o B) **[9]**.

En la preconcentración mediante SPE en fase reversa uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta es el tipo de fase móvil y el eluyente que se va a utilizar. En el caso de resinas tipo C_4 se ha establecido que la elución de proteínas presentes en el huevo (ovoalbúmina) puede llevarse a cabo con acetonitrilo, isopropanol, etanol o mezclas de los anteriores, siendo el más eficiente y el que ofrece mejores recuperaciones el acetonitrilo **[10]**. Como eluyente para soportes de C_4, se ha utilizado, también, la mezcla acetonitrilo-ácido trifluoroacético para preconcentrar proteínas como la insulina, la hormona humana del crecimiento y el glucagón **[11]**. En otros trabajos en los que se ha utilizado o bien cromatografía en fase reversa con columnas de C_{18} o SPE con C_{18}, en la extracción, purificación o preconcentración de proteínas, la elución se ha llevado a cabo con una mezcla isopropanol/agua (15:85 (v/v)) **[12]**, cloroformo/isopropanol (3:1, (v/v)) **[13]**, acetonitrilo/ácido trifluoroacético (gradiente en acetonitrilo 0-60%) **[14]**, acetonitrilo/fosfato sódico a pH 2,5 (90:10 (v/v)) **[5]**, ácido acético/HCl (1:1; 8:1, 9:1 (v/v)) **[6]** o metanol/agua/ácido trifluoroacético (80:20:0,1 (v/v/v)) **[7]**.

Entre las técnicas de preconcentración aplicadas específicamente a MTs y MLPs destacan el sample stacking y la isacotaforesis, cuando se emplea la CE como técnica de separación y detección **[15]** y la SPE **[16]**. Diversos estudios demuestran que cuando se utiliza ICP-MS con un nebulizador de alta eficiencia (HEN, *High Efficiency Nebulizer*) o Babington, como sistema de detección acoplado al CE, los límites de detección y la reproducibilidad mejoran. Además, se logra detectar el Cd, Cu y Zn ligado a ambas isoformas **[15]**. La SPE con soportes de divinilbenceno se ha aplicado para preconcentrar MTs procedentes de hígado de oveja previa a su separación y determinación por CE **[17]**.

Otro método de preconcentración aplicado a las MTs es el empleado por *Kabzinski* **[18-20]**, consistente en utilizar la SPE con soportes de afinidad de intercambiadores tiol-disulfuro como método de preconcentración. Este tipo de cromatografía de afinidad se basa en la reacción de intercambio entre puentes disulfuro (-S-S-) fijados en el soporte insoluble y los grupos tiólicos (-SH) de las proteínas separadas. La separación y preconcentración va a depender del pH de las disoluciones reguladoras empleadas, tipo de MT, distancia entre los grupos intercambiadores de la resina y tipo de ligando intercambiador. La concentración de las MTs se determina de forma indirecta, a través del contenido metálico ligado a la columna de cromatografía de afinidad covalente. Primero, se lleva a cabo una separación en cromatografía de gel de baja presión, con una columna tipo Sephadex G-75, y a continuación se realiza sobre las MTs obtenidas en la separación anterior otra separación mediante SPE con gel de afinidad covalente. En este caso

vamos a tener dos pasos de elución, uno en el que se eluyen las fracciones que no se unen al gel (proteínas y metales), y otra en que se eluyen los compuestos de interés, ligados a las MTs. La concentración de MT se determina a través de métodos como el de *Lorry*, mientras que la concentración metálica se determina mediante espectrometría de absorción atómica. La principal conclusión a la que se llega es que los soportes para cromatografía de afinidad covalente se pueden emplear como sorbentes en SPE para la preconcentración de MTs y metales y que el número de átomos intercambiadores adecuado es entre 10 y 15 en cada cadena.

En otras ocasiones, se desarrollaron métodos basados en la preconcentración con soportes C_{60} (fullereno) mediante sistemas de inyección en flujo acoplado *on line* con FAAS para la determinación de Cd total y Cd ligado a las MTs en muestras de hígado de pescado. La preconcentración de las MTs se realiza en una columna de C_{60} en la que únicamente quedan retenidos los complejos de tipo metal-MT que a continuación son eluidos con HNO_3. Previa a la determinación de la concentración de Cd total, Cd inorgánico y Cd ligado a las MTs, se realiza una hidrólisis en medio ácido de los complejos de MTs y a continuación, se complejan los metales libres con dietilditiocarbamato de sodio, quedando los quelatos metálicos formados retenidos y preconcentrados en la columna de fullereno. Éstos se eluyen, finalmente, con MIBC. La determinación de la concentración de MTs se realiza de forma indirecta a través del contenido de Cd ligado. Los resultados en cuanto a linealidad, sensibilidad y precisión son buenos, no encontrándose interferencias con otros metales como Fe, Zn o Cu, ni sales inorgánicas **[21]**.

Otros métodos de preconcentración de MTs son aquellos basados en el proceso de liofilización y eliminación de sales, como el desarrollado por *Polec et al.* **[22]** en la determinación de los complejos de Cd (MT-Cd) presentes en el hígado de ratón por HPLC-ICP-MS o HPLC-ESI-MS, tras realizar cromatografía de exclusión por tamaños como paso preparativo. El paso de preconcentración con liofilización se hace necesario para poder realizar una buena determinación por HPLC-ESI-MS, mientras que el de eliminación de las sales se realiza porque las altas concentraciones salinas que se obtienen con la liofilización hacen que la resolución disminuya.

Si nos referimos a la técnica de detección metálica (proceso de detección del metal ligado a las MTs) en el caso de que éste se realice mediante ICP podemos decir que dependiendo del tipo de nebulizador empleado se pueden llegar a detectar unas concentraciones u otras de metal. Además, en muchas ocasiones cuando se trabaja con sistemas basados en el acoplamiento de cromatografía líquida o electroforesis capilar con espectrometría de plasma acoplado por

inducción, ya sea este último con detección por emisión o masas, nos encontramos con problemas de la interfase, ya que por ejemplo se dificulta la introducción de disolventes orgánicos en el plasma y la utilización de un sistema de respuesta adecuado para los niveles de concentración de analito que emergen de la columna **[23, 24]**. En relación a los nebulizadores, el de tipo neumático es el más común y con él se generan gotas de gran tamaño que son eliminadas al generarse el aerosol en la cámara de spray. Esto hace que se necesiten flujos de muestra bastante elevados, del orden de 1-2 ml/min, lo cual se convierte en un problema cuando se trabaja con muestras de volumen pequeño o que contienen grandes cantidades de sólidos o disolventes orgánicos **[25]**. Se han desarrollado así, para evitar los problemas relacionados con el acoplamiento y con el nebulizador de tipo neumático, una serie de nebulizadores de flujo bajo que acoplados a las técnicas de separación de flujo bajo van a ser muy efectivos. De esta forma tenemos el nebulizador de inyección directa (DIN, *Direct Injection Nebulizer*), el nebulizador ultrasónico de microflujo (μ-USN, *Microflow Ultrasonic Nebulizer*), el nebulizador de alta eficiencia (HEN), el nebulizador micro concéntrico (MCN, *Micro - Concentric Nebulizer*), el nebulizador de termospray, el nebulizador de electrospray o el nebulizador de capilar oscilante (OCN, *Oscillating Capillary Nebulizer*). El nebulizador DIN fue el primero en desarrollarse para el acoplamiento entre la espectrometría de plasma acoplado por inducción y la cromatografía líquida (LC-ICP, *Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma*) y con él se consigue una eficiencia en el trasporte del 100%, permitiendo trabajar con disolventes orgánicos y con un volumen muerto bajo. El problema principal es que no permite la desolvatación, con lo cual el enfriamiento del plasma es corriente, lo que hace que los límites de detección no sean muy buenos. En cuanto al μ-USN, con él se obtiene un aerosol estable a flujos menores del 5 μl/min y con eficiencias en el transporte del 100%. Su principal limitación es, sin embargo, su elevado coste y la alta destreza requerida en su manejo. Con el nebulizador HEN se obtienen límites de detección bajos y eficiencias en el transporte elevadas, aunque los flujos son un poco altos como para realizar un buen acoplamiento con CE o cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*). El nebulizador de electrospray opera a flujos extremadamente bajos 1-30 μl/min lo que hace que se pueda acoplar con CE; pero las mayores desventajas que presenta son la complejidad de los espectros de masas que se obtienen cuando la detección se hace mediante espectrometría de masas y las restricciones en cuanto a la composición de los disolventes **[23]**.

Existen numerosos trabajos basados en la utilización de nebulizadores que trabajan a flujos bajos como por ejemplo el presentado por *Wang et al.* **[23]** en el que se utiliza un nebulizador OCN para determinar cinco compuestos de Se de interés farmacológico, por micro y

macro LC-ICP-MS. Por otro lado, *Pergantis et al.* **[25]** emplearon un HEN en la separación y determinación de una mezcla de compuestos de As, Pb y Ta por inyección en flujo a microescala plasma acoplado por inducción espectrometría de masas (μFI-ICP-MS, *micro Flow Inyection - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) o cromatografía líquida de alta resolución a microescala plasma acoplado por inducción espectrometría de masas (μHPLC-ICP-MS, *micro High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). El modo de operación de la inyección en flujo a microescala (μFI, *micro Flow Inyection*) ofrece, junto con HEN, una serie de ventajas como buenos límites de detección, bajas pérdidas e introducción de poca matriz de muestra en el plasma. Asimismo, la utilización de cromatografía líquida de alta resolución a microescala (μHPLC, *micro High Performance Liquid Chromatography*) con HEN ofrece buenos límites de detección y una reducción importante de disolvente en comparación con la cromatografía convencional. Como conclusiones generales cabe decir que con el nebulizador HEN se obtienen buenas sensibilidades analíticas y bajos límites de detección.

OBJETIVO

OBJETIVO

Debido a la baja concentración tanto de MLP-I como de MLP-II presente en los mejillones, se hace necesario realizar un paso de preconcentración de las mismas, para poder detectar y calcular tanto la distribución como la concentración metálica de ambas isoformas mediante el sistema HPLC-ICP-OES.

Por ello, será objetivo del presente capítulo el estudiar y desarrollar distintos métodos de preconcentración de MLPs en el extracto citosólico de mejillón. Se propondrán tres procedimientos de preconcentración basados en tres principios distintos. El primero consistirá en un proceso de extracción en fase sólida (SPE) empleando soportes de C_{18} (cromatografía en fase reversa), procedimiento que se ha empleado con éxito en la preconcentración de numerosas proteínas. El segundo de los procedimientos consistirá en un proceso de liofilización del extracto citosólico y redisolución del liofilizado en un volumen mínimo de disolución reguladora. Por último, el tercer procedimiento consistirá en un proceso de preconcentración a través del uso de tubos de ultrafiltración por exclusión de tamaños, sistemas diseñados exclusivamente para preconcentrar proteínas que presentan un determinado tamaño molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de cloruro de arsénico (III) de 1000 µg/ml de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Disolución patrón de nitrato de níquel de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de vanadio de 997±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de estaño (II) de 1000±5 µg/ml de BDH (Poole, Reino Unido).
* Disolución patrón de cloruro de cobalto de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de silicio de 1005±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de dióxido de selenio de 1001±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de bario de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de nitrato de estroncio de 999±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de aluminio de 1000 µg/ml, (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de hierro (III) de 1000 µg/ml (Pekin Elmer).
* Tris-(hidroxietil)-aminometano de Riedel-de Haën (Steinheim, Suiza).
* 2-Mercaptoetanol 99% (Fluka).
* Fenilmetilsulfonil fluoruro 99% (Fluka).
* Cloruro sódico (Merck).
* Ácido clorhídrico 37% de J. T Baker (Deventer, Holanda).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Ácido tricloroacético 99,5% (Merck).
* Isopropanol P.A. (Panreac)
* Acetato sódico 99-101% (Panreac).
* Ácido acético glacial 99,8% (Panreac).
* Argón, Airliquide N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).
* Nitrógeno Airliquide B-50 (Jaime Rey).
* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp. (Massachusetts, Estados Unidos).

3.*2- MATERIAL*

* Especrofotómetro de Emisión Atómica con Plasma Acoplado por Inducción modelo Optima 3300 DV Perkin Elmer, (Norwalk, Estados Unidos).
* Muestreador AS 91 (Perkin Elmer).
* Bomba Peristáltica (Perkin Elmer).
* Bomba de HPLC 515 de Waters (Milford, MA, Estados Unidos).
* Detector de UV-VIS 486 (Waters).
* Software Millennium (Waters).
* Inyector, válvula de inyección Rheodyne 7725i de Rheodyne (Cotati, CA, Estados Unidos).
* Jeringa Hamilton de 100 µl modelo 81030 de Hamilton (Reno, Nevada, Estados Unidos).
* Columna de vidrio de intercambio iónico DEAE-5PW, 8X75 mm (Waters).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* Bomba peristáltica Wilson Minipuls3 de Wilson (Middleton, Estados Unidos).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen, modelo 3-10 de Sigma (Osterode, Alemania).
* Centrífuga Centromix, modelo 540 de Selecta (Barcelona, España).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen, modelo 2K15 (Sigma).
* Peachímetro Thermo Orion, modelo 720 de Orion Research (Cambridge, Reino Unido).
* Electrodo Thermo Orion 8102BN (Orion).
* Balanza Sartorios BL 610 (Selecta).
* Balanza Sartorius BP 121 S (Selecta).
* Filtros de acetato de celulosa no estéril de diámetro de poro 0,20 µm de Albet (Barcelona, España).
* Tubos de ultrafiltración Amicon Ultra-15 de tamaño molecular de corte 5000 D de Millipore (Massachusett, Estados Unidos).
* Cartuchos de C_{18} Sep-Pak para SPE (Waters).
* Columnas cromatográficas de vidrio (35 cm de longitude y 15 mm de diámetro) con fritra de vidrio sinterizado integrada y llave de PTFE (Selecta).
* Liofilizador LYPH-LOCK6, modelo 77530 de Laboconco Corporation (Kansas City, Estados Unidos).
* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.

* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

3.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón. A continuación, se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10% durante al menos 48 horas. Posteriormente, se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q y por último el material se seca en estufa. Una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena.

*3.4- PRECONCENTRACIÓN POR SPE DE LAS ISOFORMAS **MLP-I** Y **MLP-II** CON SOPORTES DE C_{18}*

Una de los parámetros a tener en cuenta en la optimización de la preconcentración de las MLPs de mejillón con soportes C_{18} es la posible degradación de las mismas con el pH. Por ello, se realizó un estudio de la estabilidad de las MLPs de los extractos citosólicos con el pH. Tras preparación de un extracto citosólico por el método de percusión, y tras filtrado del mismo (0,22 μm), se añadieron volúmenes crecientes de una disolución de HCl de concentración 10 mM, registrando el pH y observando presencia de turbidez (precipitación de las MLPs)

Tras la realización del proceso anterior se observó que en torno a un pH de 4,7 aparece turbidez. Éste es un dato importante a tener en cuenta en la preconcentración, ya que dependiendo de los eluyentes que se utilicen podemos variar el pH de las MLPs y hacer que éstas cambien su composición y/o conformación.

3.4.1- ENSAYOS CON CARTUCHOS COMERCIALES DE C_{18}

En un primer momento se realizaron ensayos con cartuchos de C_{18} comerciales, previa descontaminación con HNO_3 2M según recomendaciones para el empleo de éstos en la determinación de especies metálicas **[26]**. A continuación, estos cartuchos se acondicionaron con lavados repetidos con agua Milli-Q y metanol.

Como eluyente, se ha seleccionado la disolución reguladora TRIS-HCl a distintos valores de pH y manteniendo constante la fuerza iónica (concentración) de la misma en un valor de 200-200 mM. La variación del pH se consigue cambiando las proporciones, en volumen, de los constituyentes TRIS y HCl de la disolución reguladora. La combinación de los volúmenes de las disoluciones de TRIS y HCl, así como el pH correspondiente a cada una, se muestran en la **tabla 5.1**; mientras que en la **figura 5.1** representa la relación V_{TRIS}/ V_{HCl} frente al pH.

Tabla 5.1: Relación de volúmenes TRIS-HCl, combinaciones de volumen de TRIS-HCl y pHs obtenidos para cada combinación

V_{TRIS}/ V_{HCl}	Volumen TRIS/ml	Volumen HCl/ml	pH
0,67	40	60	1,39
0,96	49	51	2,00
1,00	50	50	2,23
1,04	51	49	6,64
1,13	53	47	7,45
1,22	55	45	7,45
1,50	60	40	8,07
2,33	70	30	8,32
4,00	80	20	8,73
9,00	90	10	9,17
-	100	0	10,74

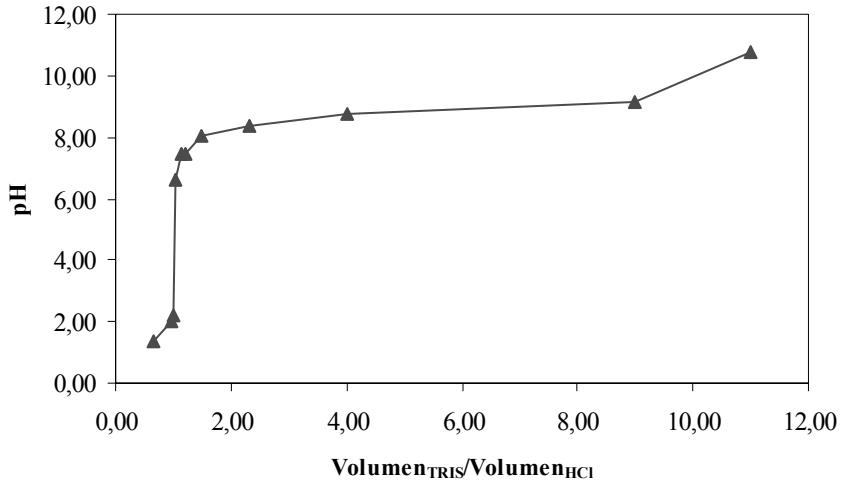


Figura 5.1: Representación de la relación V_{TRIS}/ V_{HCl} frente al pH, para la disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM

Como se puede observar, con esta disolución reguladora no podemos obtener pHs en el rango 4,8-6,6, ya que la disolución reguladora TRIS-HCl opera mejor a pHs básicos, con lo cual trabajaremos a un pH por encima de 6,6.

Por otra parte, y dado que la preconcentración se lleva a cabo impulsando el extracto citosólico y el eluyente mediante una bomba peristáltica, se estudió la relación entre el flujo del sistema en rpm y el caudal en ml/min. Dicha relación queda reflejada en la **figura 5.2** para la bomba peristáltica usada.

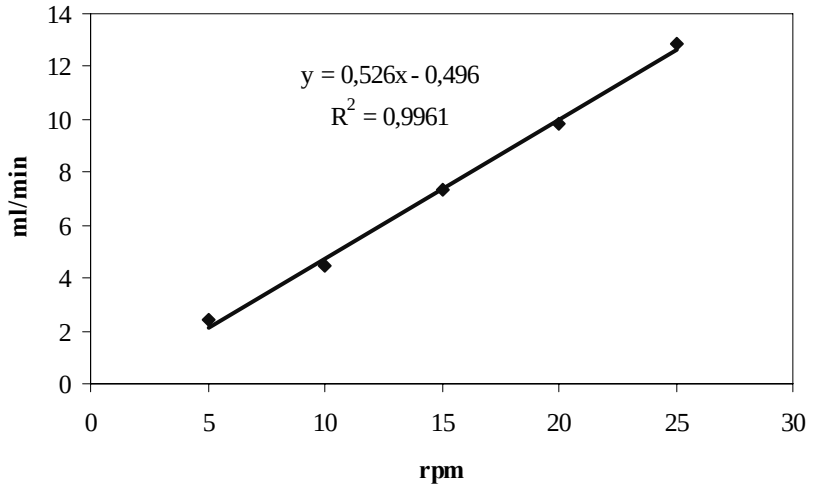


Figura 5.2: Representación de la relación del flujo en rpm y ml/min

En estos estudios preliminares, un volumen de 25 ml de extracto citosólico se pasó a través de un cartucho SEP-PAK C_{18} a 5 rpm, y a continuación se hizo pasar disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM de pH 7,4 como disolución de lavado. Por último, se eluyeron las MLPs retenidas con 2 ml de disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM del pH a estudiar. Tras recoger todas las fracciones (carga, limpieza y elución) y cromatografíar éstas según las condiciones de la **tabla 5.2** se obtienen los cromatogramas para las tres fracciones mostrados en las **figuras 5.3-5.6** en función del pH de la disolución eluyente.

Tabla 5.2: Condiciones de medida en HPLC de cambio iónico

Tipo de Columna	**Fase móvil/mM**	**Flujo ml/min**	**Volumen de inyección/µl**	**Modo de elución**	**Adquisición de los datos**	**λ/nm**
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 75-75 mM pH 7,4	0,8	200	Isocrático	Detección en UV-VIS	254

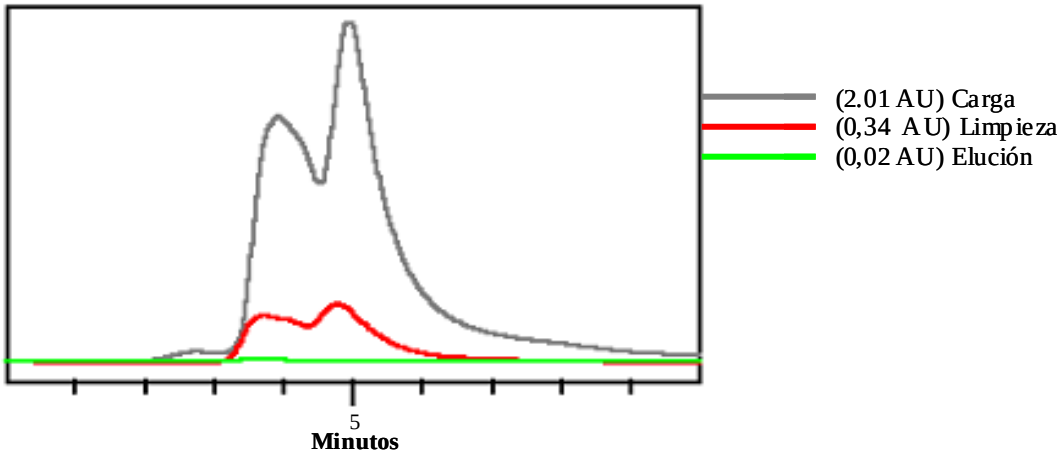


Figura 5.3: Cromatogramas para las fracciones de carga, limpieza y elución con disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM a pH 6,64

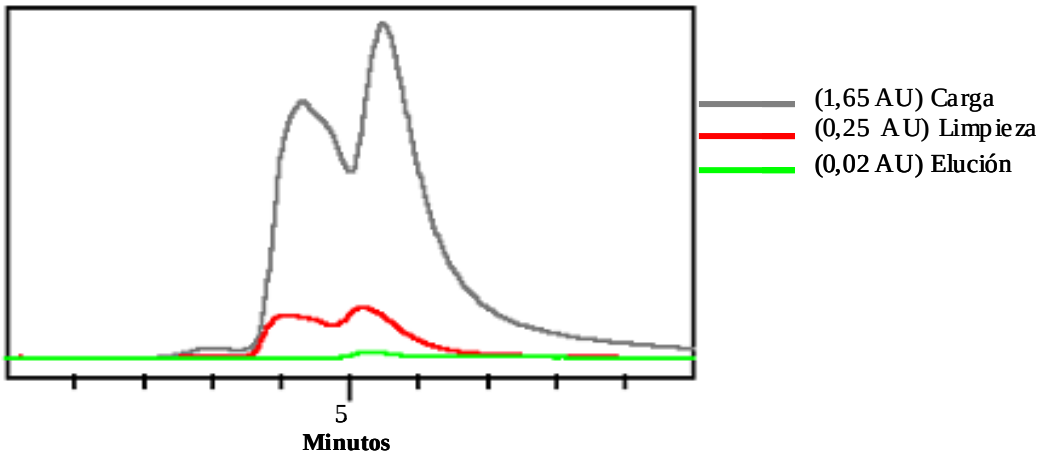


Figura 5.4: Cromatogramas para las tres fracciones carga, limpieza y elución con disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM a pH 8,34

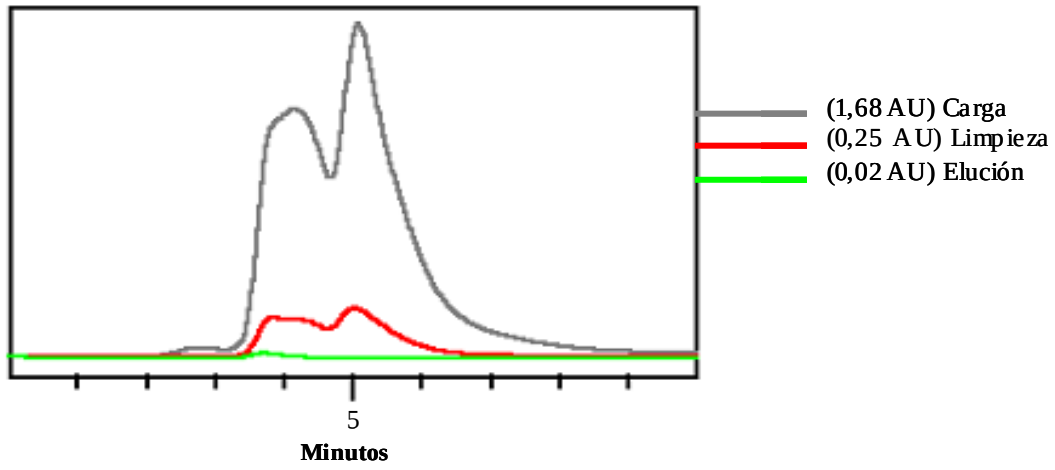


Figura 5.5: Cromatogramas para las tres fracciones carga, limpieza y elución con disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM a pH 8,73

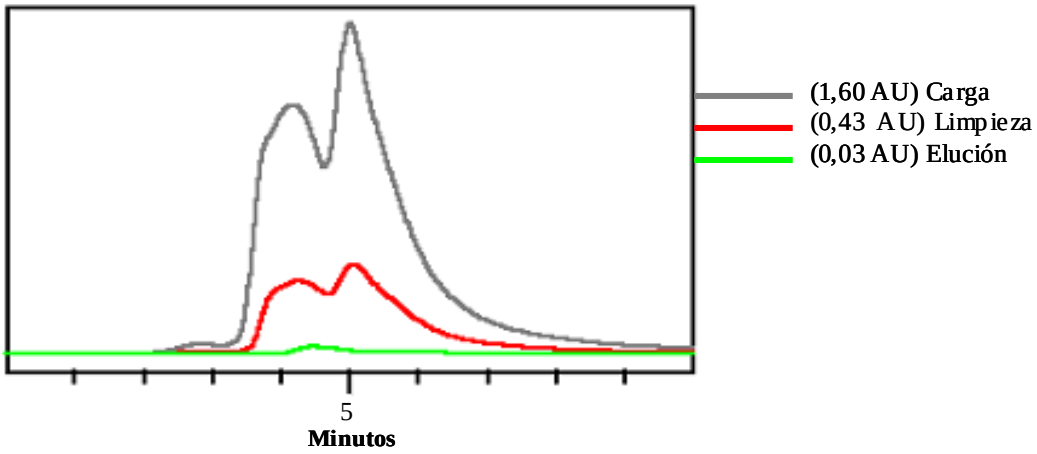


Figura 5.6: Cromatogramas para las tres fracciones carga, limpieza y elución con disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM a pH 9,17

A la vista de estos resultados podemos concluir que este tipo de cartuchos de C_{18} no nos sirven para nuestro estudio ya que las MLPs no se adsorben en las condiciones indicadas (pH 7,4 del extracto citosólico)

3.4.2- ENSAYOS PRELIMINARES CON COLUMNAS DE C_{18}

Revisando la bibliografía vemos que cuando se utiliza cromatografía en fase reversa con C_{18} para la separación de péptidos, las condiciones óptimas de trabajo en cuanto al pH son más bien ácidas. Esto nos lleva a pensar que debemos tamponar la muestra con una disolución reguladora diferente a la disolución reguladora TRIS-HCl, ya que hemos comprobado que con este último era imposible conseguir pHs entre 4,8-6,0. Por todo esto se piensa en utilizar otra disolución reguladora como el tampón acético/acetato de sodio, cuyo rango de pH se encuentra entre 3,72-5,00. De esta forma podemos trabajar al pH extremo de 4,8 tamponado la muestra con esta disolución reguladora. Este pH se obtiene mezclando 60 ml de una disolución de ácido acético 0,2 M con 40 ml de una disolución de acetato sódico 0,2 M. Una vez tamponada la muestra y comprobado que el pH de ésta es 4,8 y no precipitan las MLPs, se procede a realizar la preconcentración. Para ello se hace pasar la muestra tamponada por la columna de vidrio con C_{18} (0,25 g de resina) a un flujo de 10 rpm. A continuación, se limpia el sistema con agua Milli-Q y por último, se eluyen las MLPs retenidas con 2,5 ml de disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM pH 7,4 (3 veces). Recogidas las tres fracciones, se cromatografían (**tabla 5.2**) y los cromatogramas obtenidos son los mostrados n la **figura 5.7**.

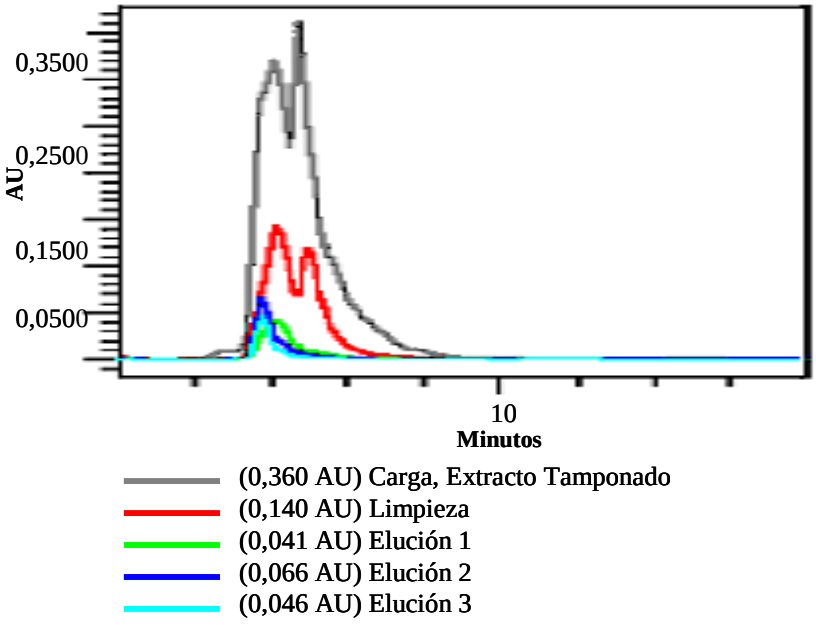


Figura 5.7: Cromatogramas obtenidos para las tres fracciones: carga, limpieza y elución (3 eluciones)

Como se puede observar, en este caso tampoco se logra una buena preconcentración, aunque podemos decir que es necesario más volumen de eluyente porque con 2 ml no se logra eluir todos los analitos retenidos. Sin embargo, queda claro que a pH inferior es posible conseguir una interacción mayor entre las MLPs y la fase sólida de C_{18}.

Debido a todo esto, los siguientes experimentos se llevaron a cabo empleando una cantidad de soporte C_{18} mayor. Para ello, se utiliza una columna de vidrio que se rellena con 1,75 g de resina. La muestra se tamponó con una disolución reguladora ácido acético/acetato sódico 2,0/2,0 mM de pH 4,8, pasando la misma por la columna a 10 rpm. Tras la limpieza, esta vez con disolución reguladora ácido acético/acetato sódico 2,0/2,0 mM de pH 4,8, se procedió a la elución con 2 ml de disolución reguladora TRIS-HCl 200-200 mM pH 7,4 (4 veces). Las fracciones se recogen y miden por HPLC de cambio iónico en las condiciones mostradas en la **tabla 5.2**. Al observar los cromatogramas (**figura 5.8**) se ve que las fracciones de carga y limpieza presentan mayor concentración de MLP que las de elución.

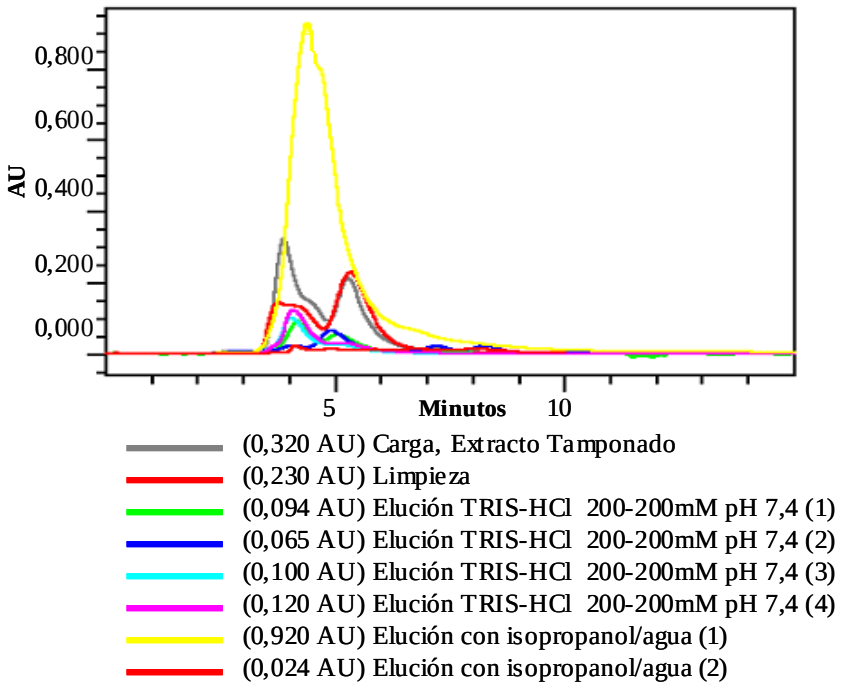


Figura 5.8: Cromatogramas superpuestos para las distintas fracciones recogidas en el ensayo con la columna de vidrio rellenas con C_{18}

Se decide entonces probar a eluir con una mezcla de isopropanol/agua al 60:40. Sobre la las MLPs supuestamente retenidas en la fase sólida, se adicionaron dos volúmenes de isopropanol/agua, que se recogieron y se cromatografíaron. En la **figura 5.8** podemos ver que con la mezcla isopropanol/agua se logra eluir una cantidad importante de MLP retenida, comprobando que la fuerza de elución de la disolución reguladora TRIS-HCl no es suficiente. Por otro lado, siguen existiendo pérdidas de MLPs, ya que éstas se encuentran presentes en las fracciones de carga y limpieza. Esto puede ser debido a que las condiciones de carga no están todavía optimizadas.

3.4.3- OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRECONCENTRACIÓN DE MLPs DE MEJILLÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON SOPORTES DE C_{18}

3.4.3.1- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS

Antes de proceder a la optimización de las variables que influyen en el proceso de preconcentración, se reoptimizó la concentración de fase móvil TRIS-HCl y el flujo en el sistema HPLC. Primero, se optimizó la concentración de fase móvil manteniendo constante el flujo (0,8 ml/min) y probando concentraciones de 5, 10, 20, 50, 75, 100 y 200 mM. La señal del detector UV-VIS al inyectar las fracciones de carga y elución, obtenidas según el último procedimiento descrito (elución isopropanol/agua) se muestran en las **figuras 5.9** y **5.10**.

Como puede verse, una importante parte de MLP no es retenida por la resina C_{18}, tal y como se comentó previamente. Por otra parte, según podemos apreciar en la **figura 5.10**, a menores concentraciones de fase móvil se consigue una mejor resolución de las dos isoformas. De esta manera, se seleccionó como concentración de fase móvil óptima TRIS-HCl 10-10 mM.

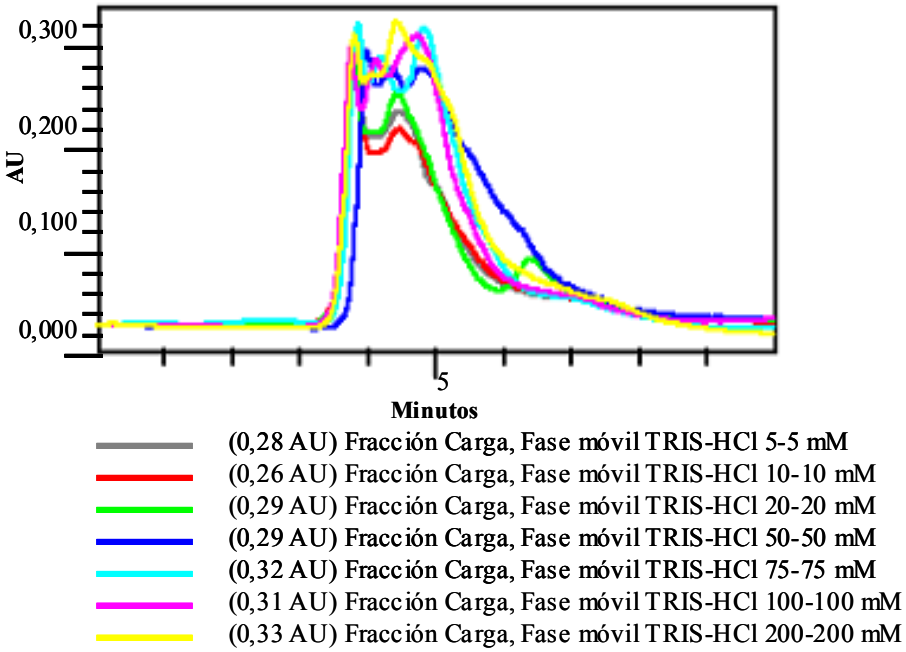


Figura 5.9: Cromatogramas superpuestos para la fracción carga obtenidos para las diferentes concentraciones de fase móvil TRIS-HCl

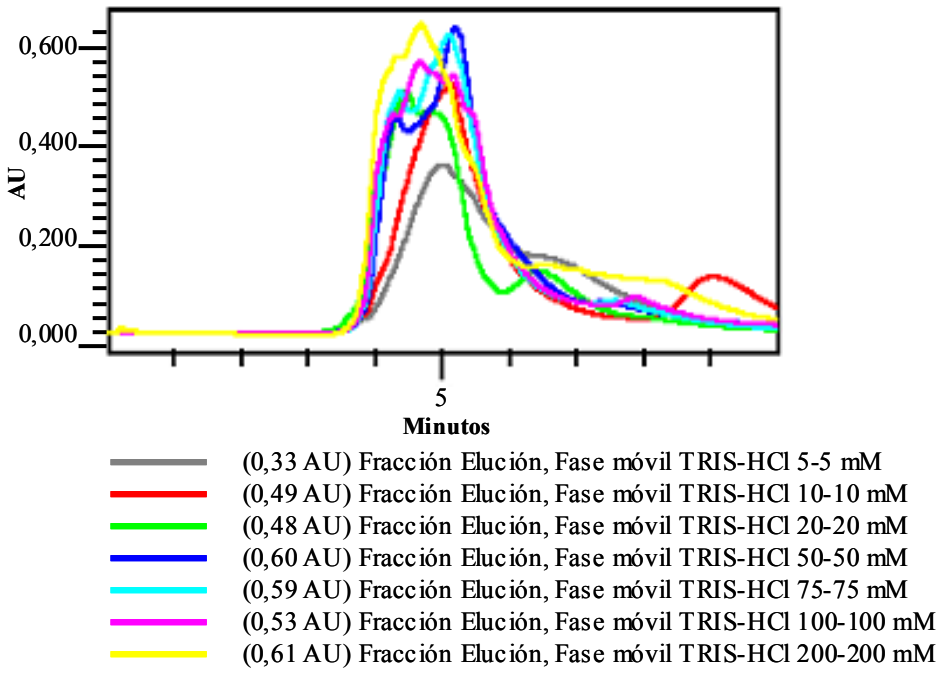


Figura 5.10: Cromatogramas superpuestos para la fracción elución obtenidos para las diferentes concentraciones de fase móvil TRIS-HCl

La reoptimización del flujo de fase móvil en el sistema de HPLC, manteniendo constante la concentración de fase móvil en 10 mM, se llevó a cabo probando los flujos de 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 y 1,2 ml/min. Al igual que en el caso del estudio de la concentración de fase móvil, se registraron los cromatogramas de las fracciones de carga y elución de un extracto preconcentrado con C_{18}. Tras observar las **figuras 5.11** y **5.12**, en las que se representan las superposiciones de los cromatogramas para la carga y elución a los diferentes flujos estudiados, se comprueba que el flujo de fase móvil más adecuado es 0, 8 ml/min.

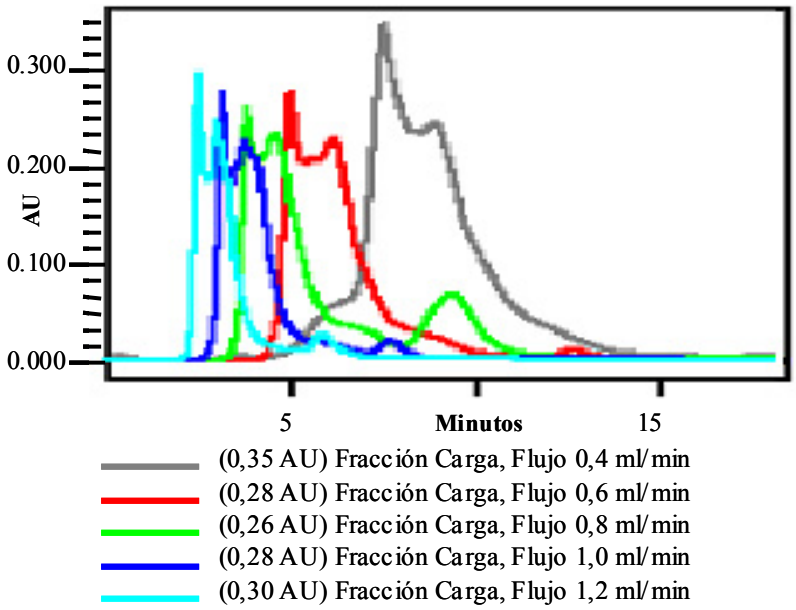


Figura 5.11: Cromatogramas superpuestos para la fracción carga obtenidos para los diferentes flujos de fase móvil TRIS-HCl 10-10mM

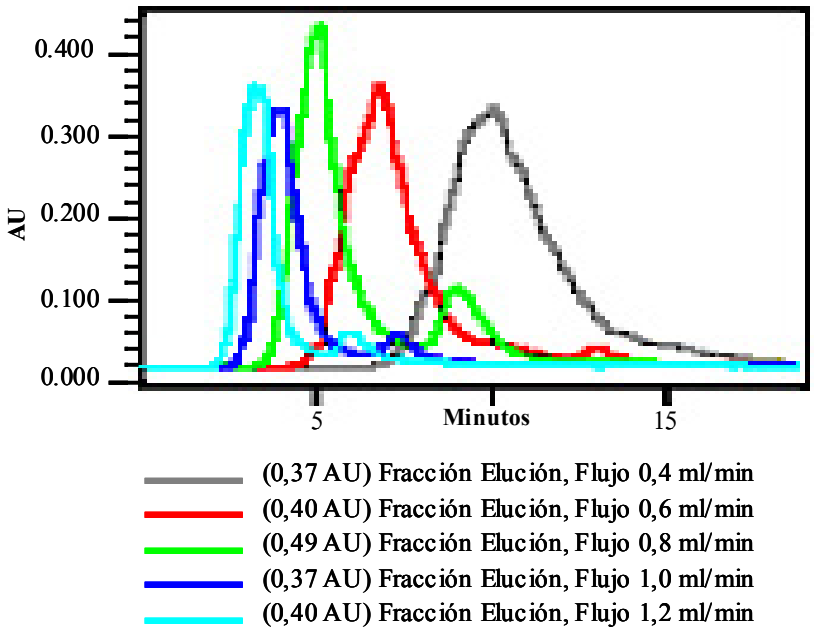


Figura 5.12: Cromatogramas superpuestos para la elución obtenidos para los diferentes flujos de fase móvil TRIS-HCl 10-10mM

3.4.3.2- OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE CARGA

Mediante el uso de diseños de experimentos se estudiaron las variables que afectan al proceso de carga. Las variables seleccionadas fueron la cantidad de soporte C_{18}, el pH del extracto citosólico, la fuerza iónica de la disolución reguladora ácido acético/acetato sódico, el flujo de paso de muestra y dos variables fantasmas (*dummy factor*). El valor de la fuerza iónica de la disolución reguladora se equiparará a la concentración de los componentes de la misma, es decir, a la concentración de ácido acético y acetato sódico. El empleo de variables fantasma en los estudios de screening nos permite averiguar la existencia de posibles errores en los experimentos, así como el efecto de las variables no tenidas en cuenta en un principio. Los valores superiores e inferiores de cada variable de estudio se muestran en la **tabla 5.3**.

Tabla 5.3: Intervalo de valores de las distintas variables para el diseño Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$

Variables	Valor inferior (-)	Valor superior (+)
Masa de soporte C_{18}/g	0,5	2,5
pH del extracto citosólico	4,8	6,6
Fuerza iónica de la disolución reguladora/M[a]	0,05	0,4
Flujo/rpm	5	30
Dummny 1	-1	+1
Dummny 2	-1	+1

[a] Concentración de ácido acético-acetato sódico

Con los valores fijados para las variables se crea un diseño Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$, 6 factores a 2 niveles, un centro y dos réplicas (2 variables respuesta, MLPI y MLP-II) mediante el programa estadístico Statgraphics 5.0 **[27]**. Dicho diseño es una matriz compuesta por 6 columnas, que representan las seis variables propuestas para el estudio, y 26 filas (13 experimentos por duplicado) resultado de las combinaciones de las distintas variables a los dos niveles, inferior y superior. Esta matriz, con las 13 primeras filas, se muestra en la **tabla 5 4**.

Tabla 5.4: Matriz de diseño Plackett-Burman para la optimización del proceso de carga en la preconcentración con C_{18}

Nº Exp.	Masa C_{18}/g	pH	[HAc/NaAc]/M	Flujo/rpm	Dummy 1	Dummy 2
1	2,5	4,8	0,40	5	-1	-1
2	2,5	6,6	0,05	30	-1	-1
3	0,5	6,6	0,40	5	+1	-1
4	2,5	4,8	0,40	30	-1	+1
5	2,5	6,6	0,05	30	+1	-1
6	2,5	6,6	0,40	5	+1	+1
7	1,5	5,7	0,23	17,5	0	0
8	0,5	6,6	0,40	30	-1	+1
9	0,5	4,8	0,40	30	+1	-1
10	0,5	4,8	0,05	30	+1	+1
11	2,5	4,8	0,05	5	+1	+1
12	0,5	6,6	0,05	5	-1	+1
13	0,5	4,8	0,05	5	-1	-1

Una vez construida la matriz de diseño se procedió a la realización de los diferentes experimentos (por duplicado) junto con sus blancos, siguiendo las condiciones establecidas por ésta. El paso de limpieza se llevó a cabo adicionado 2 ml de extractante y el de elución con 2 ml de una mezcla isopropanol/agua/ácido tricloroacético 60,0/39,9/0,1. En cada caso, se recogieron las fracciones de carga, limpieza y elución, inyectando éstas en el sistema de HPLC bajo las condiciones de medida mostradas en la **tabla 5.5.**

Tabla 5.5: Condiciones de medida en HPLC de cambio iónico para la realización del diseño Plackett-Burman

Tipo de Columna	**Fase móvil/mM**	**Flujo ml/min**	**Volumen de inyección/µl**	**Modo de elución**	**Adquisición de los datos**	**λ/nm**
DEAE-5PW 8x75 mm	TRIS-HCl 10-10 mM pH 7,4	0,8	200	Isocrático	Detección en UV-VIS	254

Los cromatogramas obtenidos para cada experimento y su réplica se integran en área y tras restarle el blanco, los resultados para ambas isoformas, MLP-I y MLP-II, se muestran en la **tabla 5.6**.

Tabla 5.6: Valores en área para las isoformas MLP-I y MLP-II en cada experimento y su réplica

Experimento		**Área**	
1-14	MLP-I	31037608	24073751
	MLP-II	25425770	19228930
2-15	MLP-I	17483760	35932286
	MLP-II	10191221	13636265
3-16	MLP-I	7403283	6329187
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
4-17	MLP-I	36895859	35466438
	MLP-II	24034689	23164614
5-18	MLP-I	32422832	328884753
	MLP-II	16639766	17051374

Tabla 5.6 ***(Continuación)*****:** Valores en área para las isoformas MLP-I y MLP-II en cada experimento y su réplica

Experimento		**Área**	
6-19	MLP-I	31291509	38414802
	MLP-II	17778847	20097166
7-20	MLP-I	20173413	27216634
	MLP-II	8333201	10972335
8-21	MLP-I	7640750	8487525
	MLP-II	112001	No Detectado
9-22	MLP-I	6698951	8795336
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
10-23	MLP-I	827218	5459651
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
11-24	MLP-I	33143469	38617422
	MLP-II	13059832	17457011
12-25	MLP-I	1290370	2730276
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
13-26	MLP-I	8527439	8091724
	MLP-II	No Detectado	No Detectado

Los datos de área se introducen a continuación en la matriz de diseño Plackett-Burman y se evalúa estadísticamente la importancia de cada factor mediante el uso de las cartas Pareto estandarizadas para un nivel de confianza del 95%. Estas cartas indican los factores que afectan estadísticamente al proceso de carga en la preconcentración de las MLPs con C_{18}. En la **figura 5.13** se muestra la carta Pareto de efectos principales para la variable respuesta MLP-I y en **figura 5.14** la carta Pareto de efectos principales para la variable respuesta MLP-II.

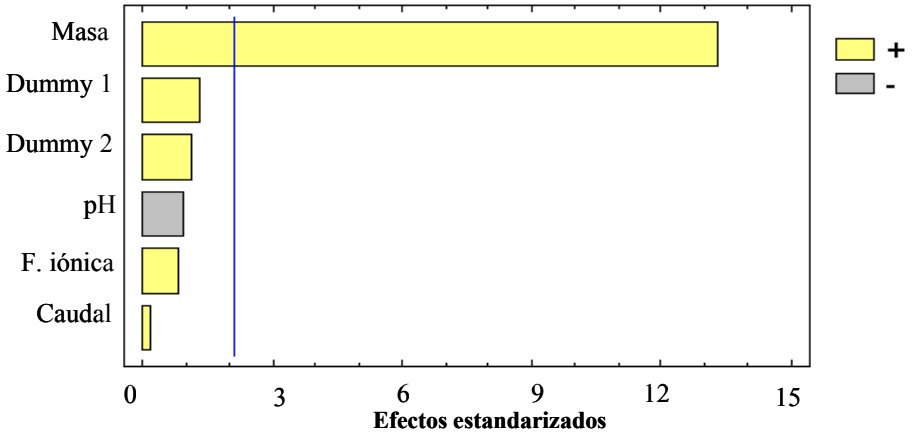


Figura 5.13: Carta Pareto para la variable respuesta MLP-I

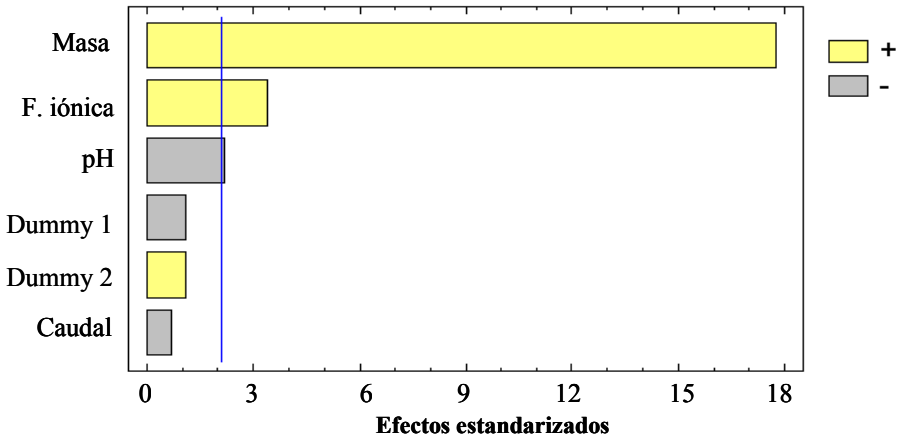


Figura 5.14: Carta Pareto para la variable respuesta MLP-II

Como se desprende de las anteriores figuras, para la preconcentración de la isoforma MLP-I es significativa únicamente la masa de soporte C_{18}, y de una forma positiva, o sea que a mayor masa mejores resultados. En cuanto a la isoforma MLP-II, tenemos como variables significativas positivas la masa de soporte C_{18} y la fuerza iónica de la disolución HAc/NaAc, y negativa el pH del extracto.

Como puede verse, el pH es significativo para la preconcentración de la isoforma MLP-II con efecto negativo. Esto quiere decir que a medida que aumenta el pH del extracto citosólico disminuye la retención de la misma. Por este motivo, la variable pH se fijará en su valor mínimo, esto es, 4,8. Por otra parte y dado que la masa de soporte C_{18} y la fuerza iónica de la disolución reguladora afectan positivamente a la retención de las distintas isoformas, estas dos variables se optimizarán de manera conjunta. Para ello, se realizará un diseño de experimentos de tipo composicional centrado de dos variables y a dos niveles, ortogonal y con dos centros, 2^2+star **[27]**. En la **tabla 5.7** podemos ver los valores superior e inferior adjudicados a cada una de estas dos variables.

Tabla 5.7: Intervalo de valores de las distintas variables para el diseño composicional centrado 2^2+star

Variables	Valor inferior (-)	Valor superior (+)
Masa de soporte C_{18}/g	1,5	5,0
Fuerza iónica de la disolución reguladora/M[a]	0,25	0,75

[a] Concentración de ácido acético-acetato sódico

Con los valores fijados de las variables se construye la matriz del diseño composicional mediante el paquete estadístico Statgraphics 5.0 **[27]**, que se muestra en la **tabla 5.8**.

Tabla 5.8 Matriz del diseño composicional centrado para la optimización de la masa de soporte C_{18} y fuerza iónica de la disolución reguladora en el proceso de carga

Nº Exp.	Masa soporte C_{18}/g	Fuerza iónica/M
1	1,50	0,25
2	5,00	0,25
3	1,50	0,75
4	5,00	0,75
5	1,36	0,50
6	5,14	0,50
7	3,25	0,23
8	3,25	0,77
9	3,25	0,50
10	3,25	0,50

Los experimentos se realizaron por duplicado con su correspondiente blanco, a un flujo de 30 rpm y a un pH de 4,8. Los pasos de limpieza y elución se llevaron a cabo de la forma ya comentada. Las tres fracciones, carga, limpieza y elución se recogieron y se analizaron por HPLC (condiciones de medida de la **tabla 5.5**). Los resultados de área obtenidos para cada experimento se recogen en la **tabla 5.9**.

Tabla 5.9: Valores en área para las isoformas MLP-I y MLP-II en cada experimento y su réplica

Experimento		**Área**	
1-11	MLP-I	7911985	9374800
	MLP-II	2348682	3204396
2-12	MLP-I	4050603	8587646
	MLP-II	2026995	3925959
3-13	MLP-I	3457234	4568580
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
4-14	MLP-I	7784113	12915729
	MLP-II	3222358	5330731
5-15	MLP-I	5480024	6337543
	MLP-II	No Detectado	595006
6-16	MLP-I	6568926	7346866
	MLP-II	1658927	3464656
7-17	MLP-I	6160038	7650011
	MLP-II	No Detectado	No Detectado
8-18	MLP-I	5903324	6487909
	MLP-II	1953031	262118
9-19	MLP-I	14332954	14480532
	MLP-II	No Detectado	2162590
10-20	MLP-I	8367189	9374800
	MLP-II	2348682	3204396

Tras la introducción de los valores de área en el diseño composicional se obtienen las superficies de respuesta para las dos variables, MLP-I y MLP-II, que se muestran en las **figuras 5.15** y **5.16**, respectivamente.

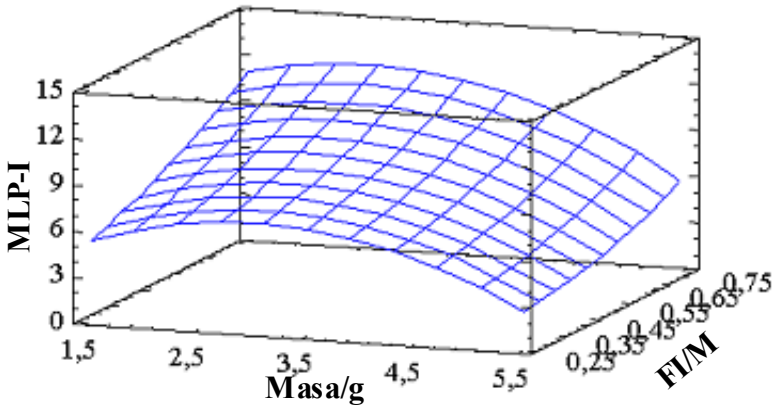


Figura 5.15: Superficie de respuesta para la variable respuesta MLP-I

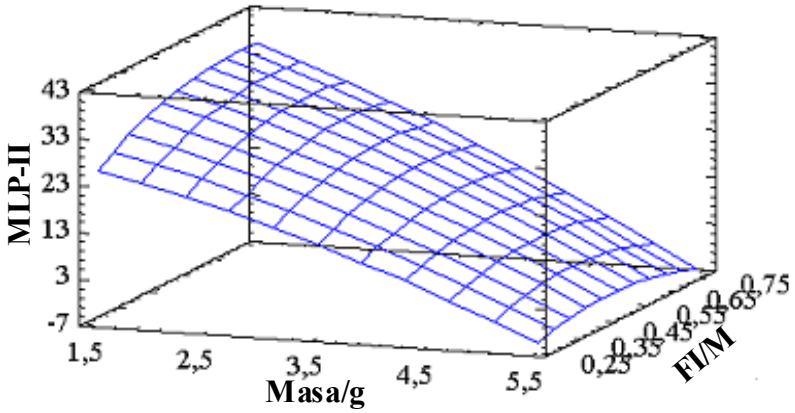


Figura 5.16: Superficie de respuesta para la variable respuesta MLP-II

Observando la superficie de respuesta correspondiente a la MLP-I vemos que con respecto a la masa el intervalo óptimo es de 1,5 a 3,9 g, mientras que la fuerza iónica o concentración de la disolución reguladora puede oscilar entre 0,65 y 0,75 M. Para la MLP-II, el intervalo óptimo para la masa de C_{18} comprende desde 1,5 g a 1,9 g y para la concentración de disolución reguladora de 0,45 M a 0,75 M. Como tenemos que trabajar en unas condiciones óptimas para las dos variables se decide tomar como masa de soporte C_{18} 1,5 g y como concentración de disolución reguladora 0,75 M. De esta forma, los valores óptimos para las variables que intervienen en el proceso de carga se recogen en la **tabla 5.10**.

Tabla 5.10: Valores óptimos para las variables sometidas a estudio en el proceso de carga

Variables	Valor óptimo
Flujo de carga/rpm	30
pH	4,8
Masa de soporte C_{18}/g	1,5
Fuerza iónica del tampón/M[a]	0,75

[a] Concentración de ácido acético-acetato sódico

3.4.3.3- OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ELUCIÓN

Una vez optimizado el proceso de carga el siguiente paso fue la optimización del proceso de elución de la isoforma MLP-I y MLP-II retenidas. En este caso las variables elegidas son el tipo de disolvente (eluyente), metanol o isopropanol, la proporción de este disolvente con respecto al agua, la concentración de ácido tricloacético (TCA), y el flujo o caudal de elución. Los valores fijados para cada variable son los que se muestran en la **tabla 5.11**. La significación de estas variables se estableció a través de un diseño factorial completo para 4 factores a 2 niveles 2^4 **[27]**.

Tabla 5.11: Intervalo de valores de las distintas variables para el diseño factorial completo 2^4

Variables	Valor inferior (-)	Valor superior (+)
Disolvente[a]	MeOH	Isopropanol
Proporción disolvente/Agua	20	40
Concentración de TCA/% (p/v)	0,1	0,25
Flujo de elución/rpm	5	30

[a] La variable *Disolvente* es una variable no continua

La matriz del diseño factorial completo 2^4 en base a los niveles asignados a cada variable según la **tabla 5.11** se muestra en la **tabla 5.12**.

Tabla 5.12: Matriz de diseño factorial completo para la optimización del proceso de elución en la preconcentración con C_{18}

Nº. Exp.	Tipo de Disolvente	Proporción Disolvente/Agua	[TCA]/% (p/v)	Flujo/rpm
1	MeOH	20	0,1	5
2	IsoPOH	20	0,1	5
3	MeOH	80	0,1	5
4	IsoPOH	80	0,1	5
5	MeOH	20	0,25	5
6	IsoPOH	20	0,25	5
7	MeOH	80	0,25	5
8	IsoPOH	8	0,25	5
9	MeOH	20	0,1	30
10	IsoPOH	20	0,1	30
11	MeOH	80	0,1	30
12	IsoPOH	80	0,1	30
13	MeOH	20	0,25	30
14	IsoPOH	20	0,25	30
15	MeOH	80	0,25	30
16	IsoPOH	80	0,25	30

Se realizaron los experimentos siguiendo el proceso optimizado para la carga y la matriz de diseño propuesta para la elución. Para cada experimento se recogieron tres fracciones, carga, limpieza (se limpia con 2 ml de extractante a 30 rpm) y elución. La inyección de ésta última en el sistema de HPLC, según las condiciones recogidas en la **tabla 5.5**, dió como resultados los valores de área mostrados en la **tabla 5.13**.

Tabla 5.13: Valores en área para cada experimento y su réplica en el diseño factorial completo 2^4

Experimento		**Área**	
1-17	MLP-I	3139346	3300507
	MLP-II	1085178	1148439
2-18	MLP-I	3031415	2775363
	MLP-II	808841	415616
3-19	MLP-I	3322614	3855381
	MLP-II	1423650	805820
4-20	MLP-I	3046551	2944504
	MLP-II	308671	584863
5-21	MLP-I	2510582	2291279
	MLP-II	264075	100038
6-22	MLP-I	1054506	1497891
	MLP-II	4588206	2952735
7-23	MLP-I	2874655	2412098
	MLP-II	446860	241434
8-24	MLP-I	2637562	2822817
	MLP-II	158618	120455
9-25	MLP-I	6360257	5278865
	MLP-II	4160469	3556061
10-26	MLP-I	3225071	3085294
	MLP-II	1228321	1262925
11-27	MLP-I	4763390	4701437
	MLP-II	3401698	3118653
12-28	MLP-I	3146380	3308820
	MLP-II	178902	208510
13-29	MLP-I	2938972	2938972
	MLP-II	3063663	3063663
14-30	MLP-I	3662534	3737065
	MLP-II	2516070	2531252
15-31	MLP-I	3652187	3249586
	MLP-II	2918921	2758293
16-32	MLP-I	50517414	5220696
	MLP-II	4000136	4291673

Evaluados los resultados a un nivel de significación del 95 % se obtuvieron las cartas Pareto de efectos principales y de interacción de orden 2 (**figuras 5.17** y **5.18**, respectivamente) para la variable respuesta MLP-I. Igualmente, ambas cartas se muestran en las **figuras 5.19** y **5.20** para la variable MLP-II.

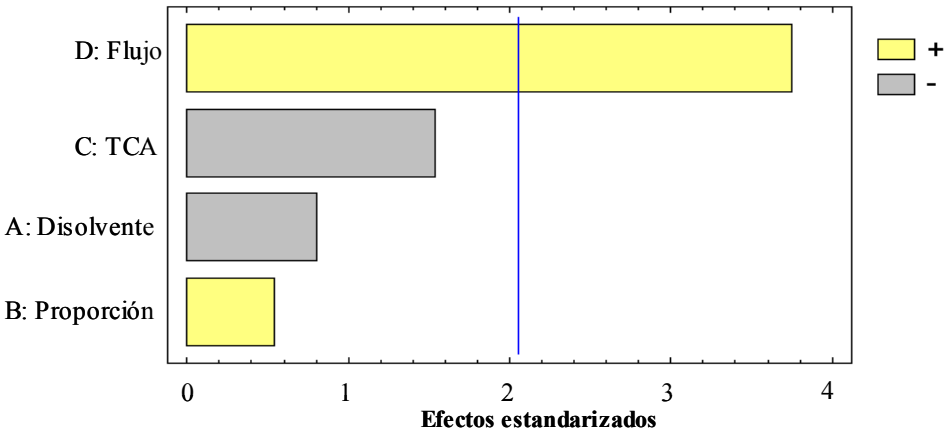


Figura 5.17: Carta Pareto de efectos principales para la variable respuesta MLP-I

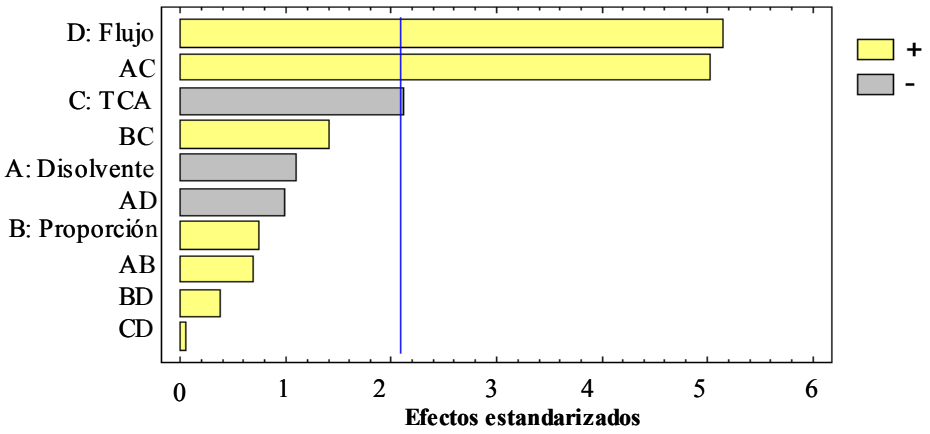


Figura 5.18: Carta Pareto de interacción de orden 2 para la variable respuesta MLP-I

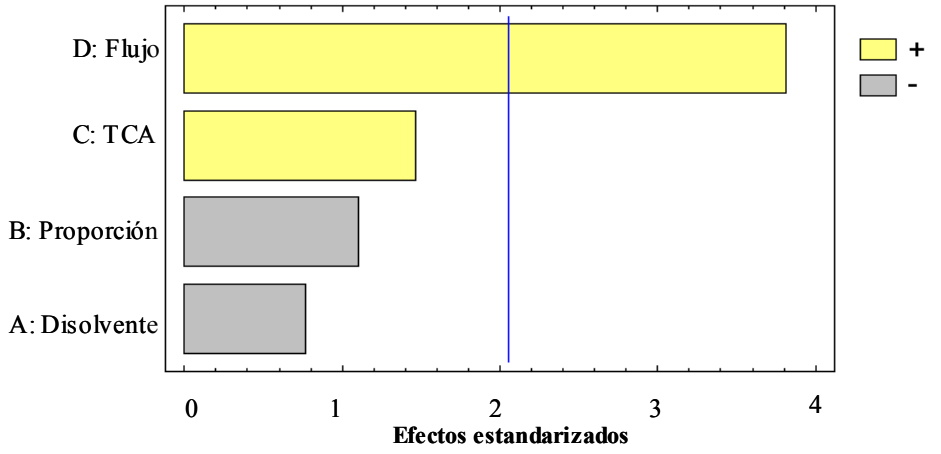


Figura 5.19: Carta Pareto de efectos principales para la variable respuesta MLP-II

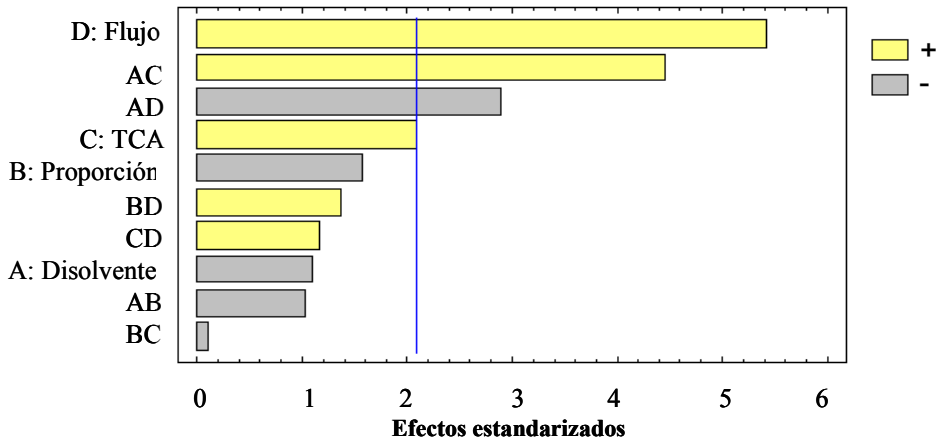


Figura 5.20: Carta Pareto de interacción de orden 2 para la variable respuesta MLP-II

Si tenemos en cuenta las cartas Pareto de interacción de orden dos, vemos que para la isoforma MLP-I las variables significativas son el flujo y la interacción disolvente/TCA (efecto positivo) y, la concentración de TCA (efecto negativo). Para la MLP-II, tenemos como variables significativas positivas el flujo y la interacción disolvente/TCA como en el caso de la MLP-I. Como variables significativas negativas tenemos la interacción disolvente/flujo.

Por tanto, tenemos que la mejor elución de las fracciones MLP-I y MLP-II se consigue trabajando con isopropanol como disolvente y a baja concentración de TCA y, además, trabajando a un flujo elevado.

En base a los resultados anteriores, la variable no continua *Disolvente* y la variable *Proporción disolvente/agua* se fijaron en sus correspondientes valores altos, esto es, isopropanol y 100 %, respectivamente. Las variables *Concentración de TCA* y *Flujo de elución*, que presenta una interacción de orden 2 significativa, se optimizaron a través de un diseño composicional centrado a dos niveles, factores y dos centros, 2^2+star. La matriz de diseño composicional centrado, según valores asignados a cada variable (**tabla 5.14**), se muestran en la **tabla 5.15**.

Tabla 5.14: Intervalo de valores de los distintos factores para el diseño composicional centrado 2^2+star

Variables	Valor inferior (-)	Valor superior (+)
[TCA]/%(p/v)	0,05	0,15
Flujo de Elución/rpm	20	40

Tabla 5.15: Matriz del diseño composicional centrado para la optimización del flujo de elución y de la concentración de TCA

Nº Exp.	[TCA]/%(p/v)	Flujo/(ml/min)
1	0,10	30
2	0,05	20
3	0,15	20
4	0,05	40
5	0,15	40
6	0,029	30
7	0,17	30
8	0,10	15,9
9	0,10	44,1
10	0,10	30

El proceso de carga se lleva a cabo de la forma optimizada, y el de limpieza como en los casos anteriores. La elución se realiza con isopropanol/TCA siguiendo las pautas marcadas por la matriz expuesta en la **tabla 5.15**. Los resultados, en área, para cada experimento junto con su réplica, una vez restado el blanco, se recogen en la **tabla 5.16**.

Tabla 5.16: Resultados en área para cada experimento y su réplica en el diseño composicional centrado

Experimento		Área	
1-11	MLP-I	5705790	5889986
	MLP-II	2002685	2046348
2-12	MLP-I	6469350	7881240
	MLP-II	2249393	4062743
3-13	MLP-I	4529198	4459326
	MLP-II	1831791	1651963
4-14	MLP-I	4879818	5148941
	MLP-II	2137373	2203634
5-15	MLP-I	7407448	7541753
	MLP-II	3485947	3062062
6-16	MLP-I	6075719	6986537
	MLP-II	2600594	2514960
7-17	MLP-I	6510849	7587875
	MLP-II	3006283	3279776
8-18	MLP-I	6283423	5324959
	MLP-II	2171320	1990274
9-19	MLP-I	6242317	6064548
	MLP-II	1265391	1137618
10-20	MLP-I	6267371	5918253
	MLP-II	3094407	2806402

Los resultados de área obtenidos se introducen en el programa estadístico y se obtienen las superficies de respuesta mostradas en las **figuras 5.21** y **5.22**.

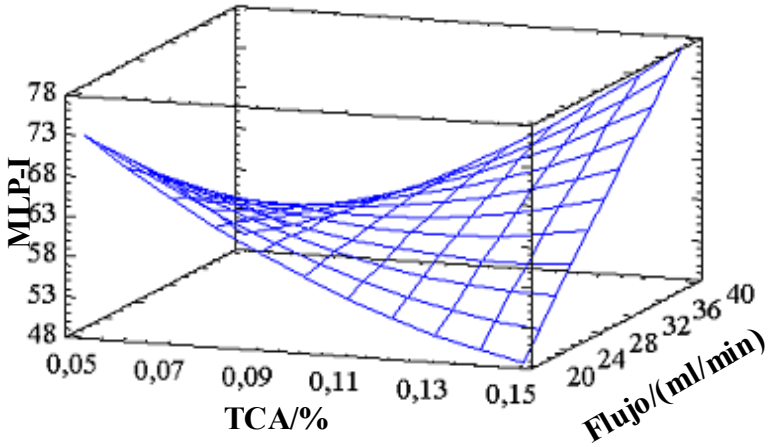


Figura 5.21: Superficie de respuesta para la variable respuesta MLP-I

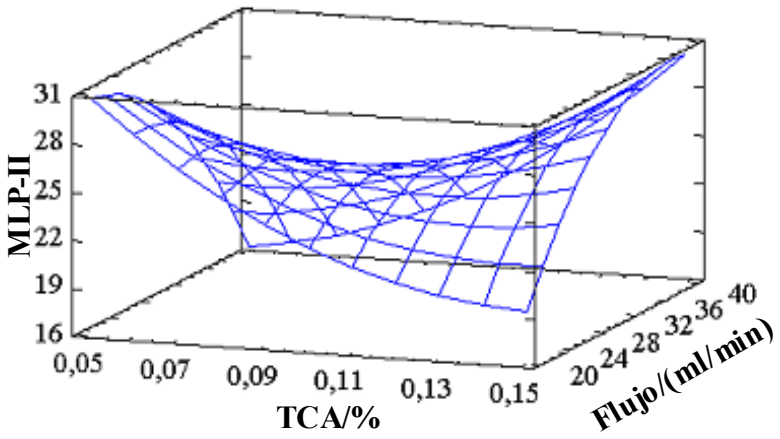


Figura 5.22: Superficie de respuesta para la variable respuesta MLP-II

A la vista de los resultados expuestos en las superficies de respuesta, se toma como flujo de elución óptimo 40 rpm y como concentración de TCA 0,15 % (p/v).

El último parámetro que nos queda por optimizar es el volumen de elución, el cual se optimiza de forma univariante, esto es, manteniendo constantes y en su valor óptimo las variables consideradas en el proceso de carga y elución y variando el volumen de elución. En la **tabla 5.17** se muestran las condiciones de trabajo empleadas para llevar a cabo este experimento.

Tabla 5.17: Condiciones de trabajo en la optimización del volumen de elución

Proceso de Carga	
Masa de soporte C_{18}/g	1,5
Flujo/rpm	30
pH del extracto citosólico	4,8-5,2
Fuerza iónica de la disolución reguladora/M[a]	0,75
Proceso de Elución	
Disolvente	99,85% Isopropanol
[TCA]/%(p/v)	0,15
Flujo de elución/rpm	40
Volumen de elución/ml	1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 4,0

[a] Concentración de ácido acético-acetato sódico

Tras realizar cada experimento por duplicado la fracción de elución se analizó por HPLC y los resultados en área obtenidos tanto para la isoforma MLP-I como para la isoforma MLP-II se muestran en la **tabla 5.18**.

Tabla 5.18: Resultados en área de cada experimento realizado para la optimización del volumen de elución

Volumen de Isopropanol/TCA/(ml)		Área
1,0	MLP-I	769887
	MLP-II	294019
1,5	MLP-I	1176312
	MLP-II	542255
2,0	MLP-I	2027754
	MLP-II	752740
2,5	MLP-I	3106705
	MLP-II	1150544
3,0	MLP-I	4257835
	MLP-II	1396401
4,0	MLP-I	8389766

Si representamos volumen frente al área se obtienen las los gráficos de las **figuras 5.23** y **5.24**, en las que se puede ver que el volumen óptimo de elución es de 4 ml para las dos isoformas de MLP.

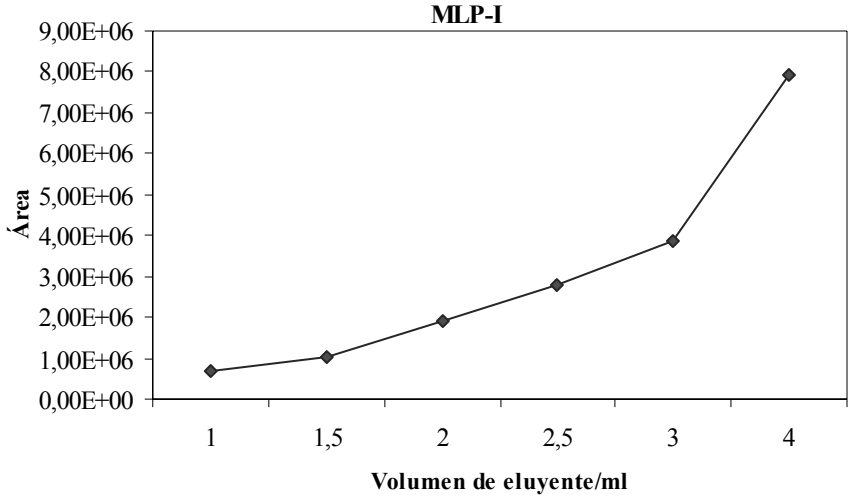


Figura 5.23: Efecto del volumen de eluyente en la elución de la isoforma MLP-I

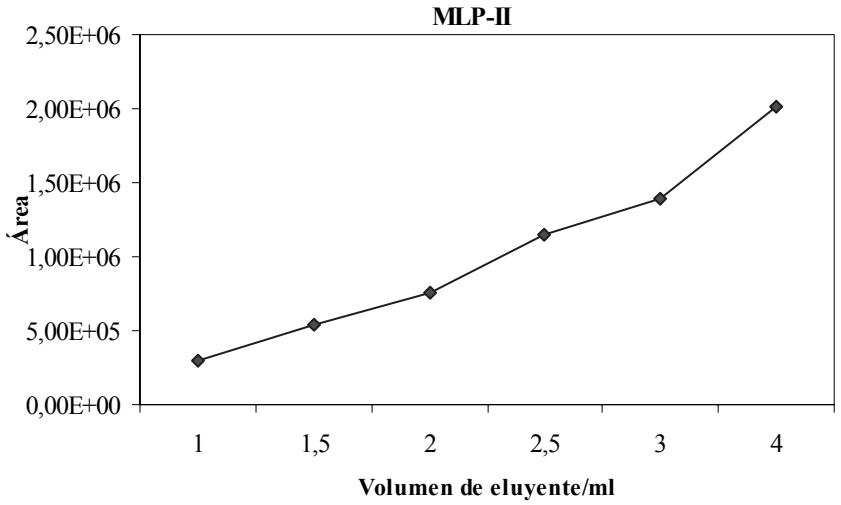


Figura 5.24: Efecto del volumen de eluyente en la elución de la isoforma MLP-II

De los estudios realizados se desprende que las condiciones óptimas de preconcentración de MLPs de mejillón con soportes C_{18} son las enumeradas en la **tabla 5.19.**

Tabla 5.19: Condiciones óptimas de preconcentración de MLPs por SFE con soportes C_{18}

Proceso de Carga	
Masa de soporte C_{18}/g	1,5
Flujo/rpm	30
pH del extracto citosólico	4,8-5,2
Fuerza iónica de la disolución reguladora/M[a]	0,75
Proceso de Elución	
Disolvente	99,85% Isopropanol
[TCA]/%(p/v)	0,15
Flujo de elución/rpm	40
Volumen de elución/ml	4

[a] Concentración de ácido acético-acetato sódico

Finalmente, en la **figura 5.25** podemos ver los cromatogramas obtenidos para un extracto citosólico sin preconcentrar y tras ser preconcentrado por SPE con soportes C_{18}.

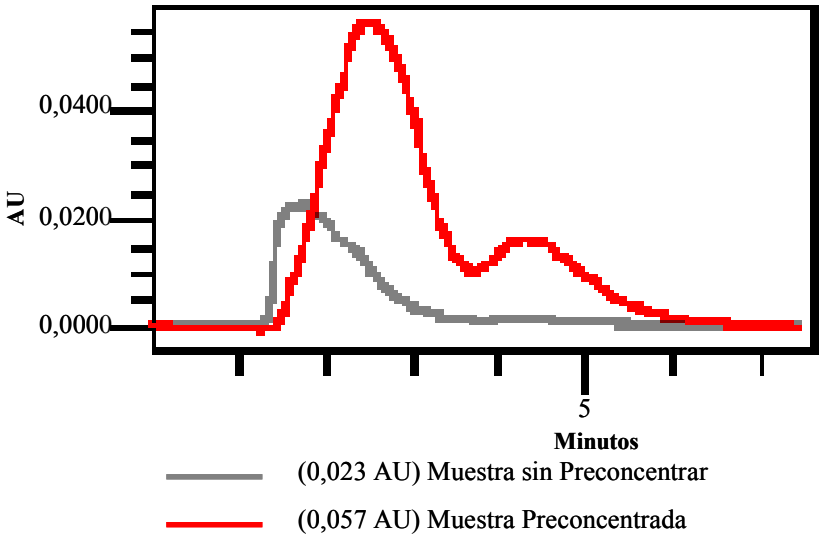


Figura 5.25: Superposición de los cromatogramas obtenidos para un extracto citosólico de mejillón sin preconcentrar y preconcentrado por SPE con soportes C_{18}

3.4.3.4- ACOPLAMIENTO HPLC-ICP-OES

Una vez optimizado el método de preconcentración de las distintas isoformas de MLPs en extractos citosólicos de mejillón, se procedió al acoplamiento del sistema cromatográfico con el detector multielemental ICP-OES para observar el perfil de metales ligados a cada isoforma preconcentrada. Las condiciones de separación cromatográficas empleadas, así como las condiciones operacionales del detector ICP-OES son las expuestas en las **tablas 5.20** y **5.21**.

Tabla 5.20: Condiciones operacionales de medida en HPLC-ICP-OES *on lin*e

Condiciones operacionales HPLC	
Volumen de inyección/µl	200
Flujo/(ml/min)	0,8
Composición de la Fase Móvil	TRIS-HCl 10-10mM, pH 7,4
Tipo de Columna	Protein Pak DEAE-5PW
Modo de Elución	Isocrático
Condiciones operacionales ICP-OES	
Potencia de Radiofrecuencias/W	1300
Flujos de los Gases/(l/min)	
Gas de Nebulización	0,85
Gas Auxiliar	1,0
Gas plasmógeno	15,0
Tipo de Nebulizador	GemCone (Cámara Ciclónica)
Flujo de muestra/ml min^{-1}	0,8
Tiempo de estabilización/s	90
Número de réplicas	120
Disposición de medida	Axial

Tabla 5.21: Elementos y líneas de detección en ICP-OES

Elemento	**Líneas de emisión**	**Elemento**	**Líneas de emisión**
Al	308,215, 394,403, 396,162	***Mn***	257,610, 259,374, 260,571
As	180,982, 193,695, 197,202	***Ni***	221,650, 231,606, 232,007
Ba	233,527, 455,422	***Pb***	217,000, 220,356, 261,392
Cd	214,437, 226,508, 228,805	***Rb***	420,074, 780,880
Cr	205,564, 267,711, 283,563	***Sr***	421,560
Cu	224,700, 324,756	***Zn***	202,534, 206,200, 213, 859
Fe	238,204, 239,574	-	

En las **figuras 5.26** y **5.27** se puede ver la superposición de algunos de los cromatogramas obtenidos para ciertos metales (Mn y Zn) ligados a las MLPs en el extracto preconcentrado y sin preconcentrar. Se observa que se obtienen señales más bajas para el extracto preconcentrado. Esto puede ser debido a que aunque se preconcentra la proteína el enlace metal-proteína se rompe durante el paso de concentración. Por tanto, si bien el procedimiento resulta adecuado para preconcentrar las MLPs (especialmente la isoforma MLP-II), no resulta adecuado para la determinación del metal ligado a éstas.

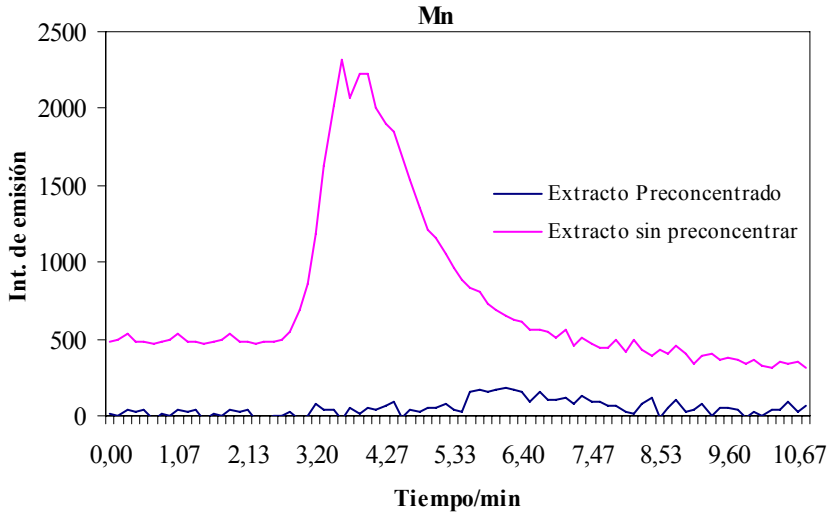


Figura 5.26: Cromatogramas superpuestos para el Mn presente en el pool de extractos preconcentrados y sin preconcentrar

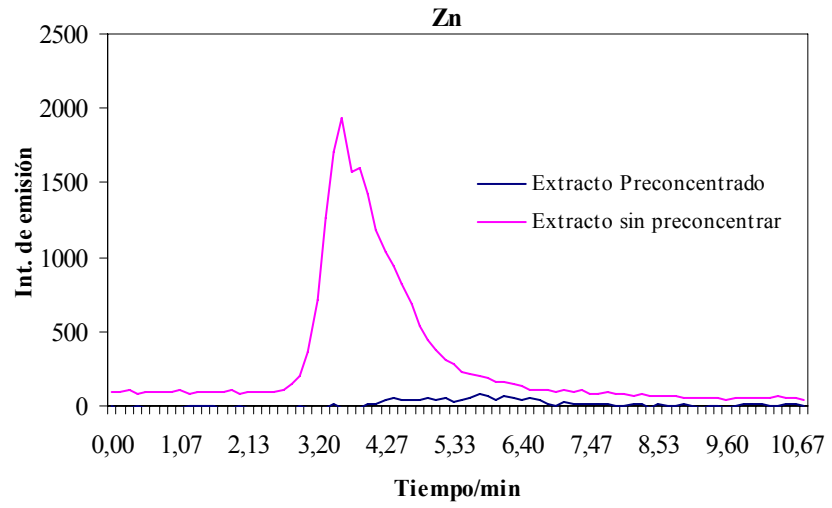


Figura 5.27: Cromatogramas superpuestos para el Zn presente en el pool de extractos preconcentrados y sin preconcentrar

3.5- ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN DE MLPs DE MEJILLÓN POR ULTRAFILTRACIÓN POR EXCLUSIÓN DE TAMAÑOS

La existencia de tubos de ultrafiltrado por exclusión molecular para preconcentración de proteínas nos hizo pensar en la utilización de éstos para preconcentrar las isoformas de MLPs de mejillón. En nuestro caso hemos utilizado los tubos Amicon Ultra-15 de Millipore que ofrecen un corte de tamaños moleculares de 5000 D. Son tubos de ultrafiltración que poseen un filtro de exclusión por tamaños a través del cual sólo pasan aquellas proteínas de un tamaño molecular inferior al tamaño molecular de corte del filtro. De esta forma, las proteínas de interés, tamaño molecular superior al del corte del filtro, quedan concentradas en un volumen mínimo dentro del tubo que contiene el filtro de corte. Un esquema de este tipo de tubos se muestra en la **figura 5.28**.

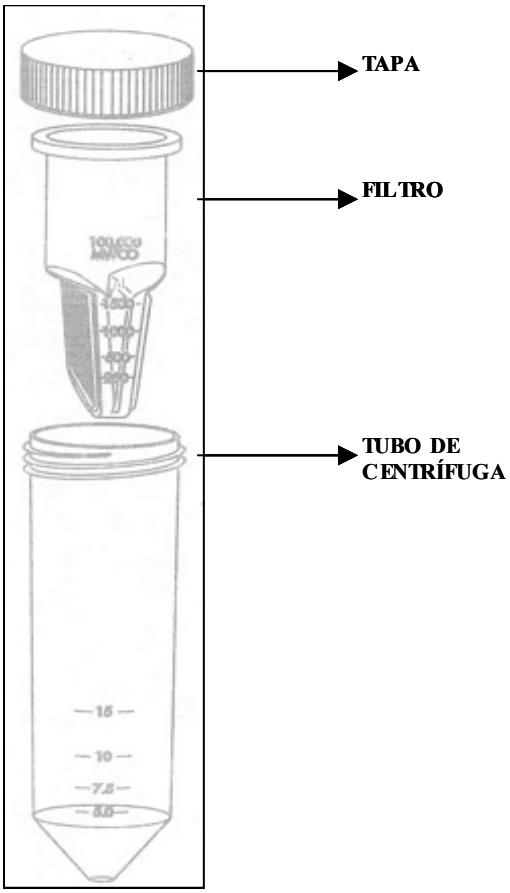


Figura 5.28: Esquema de un tubo comercial para preconcentrar proteínas y péptidos

Las características principales que presentan estos dispositivos son una rápida ultrafiltración y una elevada capacidad de concentración. Son de un sólo uso y se aplican fundamentalmente en el tratamiento de muestras biológicas que contienen antígenos, anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, microorganismos, y en purificación de componentes macromoleculares que se encuentran en tejidos y células lisadas. El equipo requerido para su empleo consta fundamentalmente de una centrífuga con rotor basculante o fijo, capaz de contener tubos de 50 ml de capacidad y una pipeta para extraer el concentrado. La fuerza centrífuga máxima que soportan es, en el caso de centrífugas de rotor basculante, 4000xg y para rotores fijos, 5000xg.

El modo de empleo es el siguiente:

1. Se introducen en el tubo 15 ml del extracto citosólico.
2. Los tubos tapados se colocan en la centrífuga enfrentando los que poseen pesos iguales.
3. Se procede a la centrifugación (4000xg para rotores basculantes y 5000xg para rotores fijos) durante un período de tiempo de entre 15-45 min.
4. Se retira el preconcentrado con una pipeta pasteur y la fracción ultrafiltrada se deja en el tubo.

Las membranas o filtros que se utilizan en estos tubos son específicas para las denominadas moléculas con peso molecular nominal (NMWL, *Nominal Molecular Weight Limit*), por lo tanto aquellas moléculas cuyo peso molecular difiera de éste van a ser retenidas parcialmente. Además la retención va a depender también del tamaño y de la forma molecular. Recuperaciones bajas indican pérdidas por adsorción o paso de soluto a través de la membrana. Las pérdidas por adsorción dependen de la concentración de soluto, de su naturaleza hidrofóbica, de la temperatura y del tiempo de contacto con el filtro, de la composición de la muestra y del pH. Para minimizar las pérdidas se recomienda extraer el preconcentrado nada más realizarse la centrifugación. Es conveniente realizar una etapa de acondicionamiento o limpieza antes de su uso con una disolución reguladora o agua desionizada para evitar interferencias. Si éstas continuasen, se lavaría con una disolución de NaOH 0,1 M **[28]**.

3.5.1- ESTUDIOS PREVIOS

En un primer momento se realizaron ensayos para estudiar el comportamiento de estos tubos en relación a las isoformas de MLPs. Se partió de 6 extractos citosólicos obtenidos mediante el método de percusión, de los cuales 13 ml se vierten en cada tubo de ultrafiltrado. Éstos se someten a centrifugación a 4000xg a diferentes tiempos, 20 min, 30 min y 40 min (por duplicado) y una vez centrifugados, se retira el preconcentrado con una pipeta pasteur, vertiendo los 12 ml restantes de cada extracto en el tubo correspondiente y procediendo a otra centrifugación en las condiciones ya citadas. El último preconcentrado se retira y se junta con el primero. Los preconcentrados obtenidos para un tiempo de centrifugación de 20 min se enrasaron a 5 ml, los preconcentrados obtenidos tras centrifugar durante 30 min se enrasaron a 2 ml y, finalmente, los relativos a un tiempo de centrifugación de 40 min se llevaron 1 ml. En todos los casos se empleó la disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM como disolvente. Los distintos preconcentrados se analizaron por duplicado por HPLC-ICP-OES *on line,* para ver el perfil metálico de las MLPs. Además, se analizaron los filtrados (porción del extracto citosólico que atraviesa la membrana o filtro de corte) de cada experiencia para realizar la comparación. Las condiciones de medida en HPLC-ICP-OES son las mostradas en las **tablas 5.20** y **5.21**. En las **figuras 5.29** y **5.30** podemos ver los cromatogramas superpuestos del preconcentrado y del ultrafiltrado para los elementos Fe y Zn.

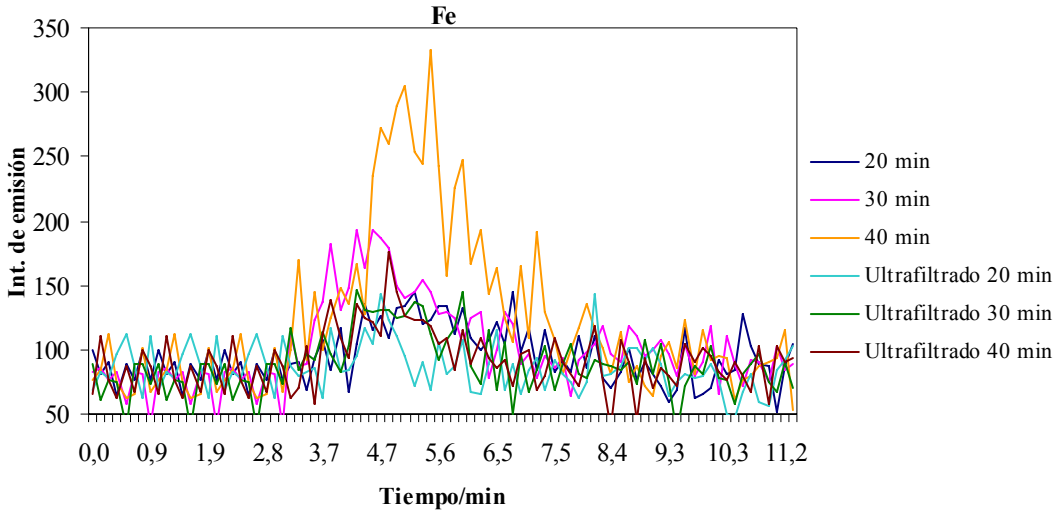


Figura 5.29: Cromatogramas superpuestos para el Fe para los distintos tiempos de centrifugación

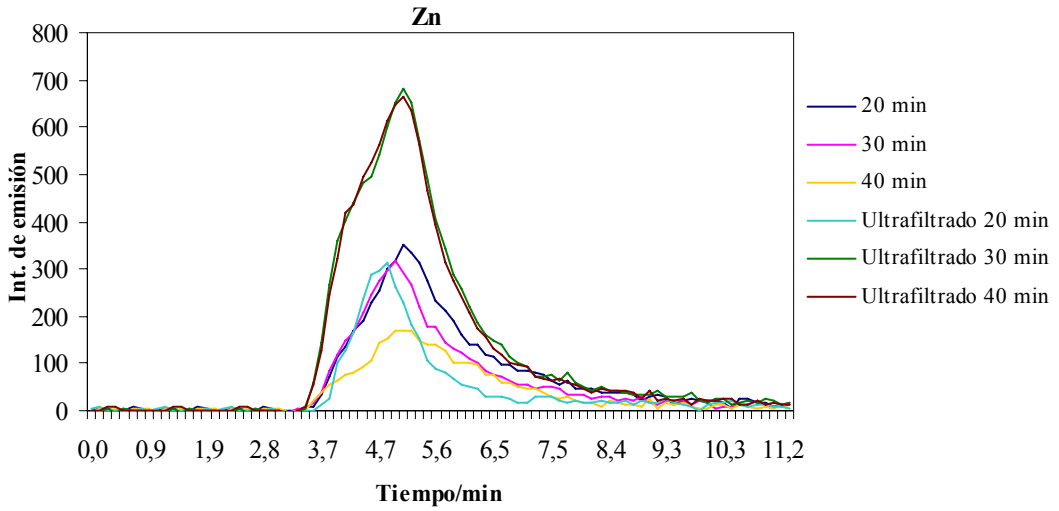


Figura 5.30: Cromatogramas superpuestos para el Zn para los distintos tiempos de centrifugación

Como se puede observar, para los dos metales expuestos, parte de las MLPs atraviesan el filtro de corte y se encuentran en el ultrafiltrado. Además, no existe una buena reproducibilidad entre las medidas; lo cual indica que es necesario optimizar los parámetros involucrados en la preconcentración tales como la velocidad y el tiempo de centrifugación. Por otra parte, se procederá, también, al estudio de la posible reutilización de cada tubo.

3.5.1.1- ESTUDIOS SOBRE LA REUTILIZACIÓN DE LOS TUBOS DE ULTRAFILTRACIÓN

Para el estudio de la reutilización de los tubos y de la existencia de posibles interferencias de tipo metálico se prepararon nuevos extractos citosólicos de mejillón y no se realizaron dos centrifugaciones como en el caso anterior, una con 13 ml de extracto y otra con los 12 ml restantes del extracto, sino que se centrifugan únicamente 15 ml del extracto citosólico, pues las especificaciones de los tubos explican que éste es el volumen óptimo de trabajo. Los experimentos realizados fueron los siguientes:

1- A dos tubos de ultrafiltración nuevos (tubos A y B) se les añadió 15 ml de extracto citosólico de mejillón, centrifugando a 4000xg durante 15 min. El preconcentrado obtenido se enrasó a 5 ml con la disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM.

2- Se cogieron otros dos tubos de ultrafiltración nuevos (tubos C y D) y se les añadió 15 ml de extractante TRIS-HCl 10-10 mM, centrifugando a 4000xg durante 15 min. Igualmente, el preconcentrado se llevó a un volumen de 5 ml con la disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM. A continuación, estos tubos de ultrafiltración se utilizaron para llevar a cabo una preconcentración en las mismas condiciones que las expuestas en el caso 1.

3- A dos tubos ya usados (tubos E y F) se les añadió 15 ml de extracto citosólico de mejillón, y se procedió al paso de preconcentración-centrifugación a 4000xg durante 15 min, diluyendo el preconcentrado a 5 ml con la disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM.

Los preconcentrados, junto con los ultrafiltrados y los extractos sin preconcentrar, se analizaron por duplicado por HPLC-ICP-OES *on line* en las condiciones resumidas en las **tablas 5.20** y **5.21**. En las **figuras 5.31** a **5.38** podemos ver los cromatogramas obtenidos para el preconcentrado, el ultrafiltrado y el extracto sin preconcentrar, superpuestos para cada experimento realizado (una réplica, tubos A, C y E). Asimismo, también se superponen los cromatogramas obtenidos para los preconcentrados en cada ensayo. En todos los casos, se representan los cromatogramas para las fracciones de Cu y Zn ligadas a las MLPs, por ser éstos los más representativos en las MTs. Cabe destacar que se obtuvieron señales elevadas para las líneas de Ba, Mn, Sr y Fe en todos los preconcentrados y ultrafitrados analizados.

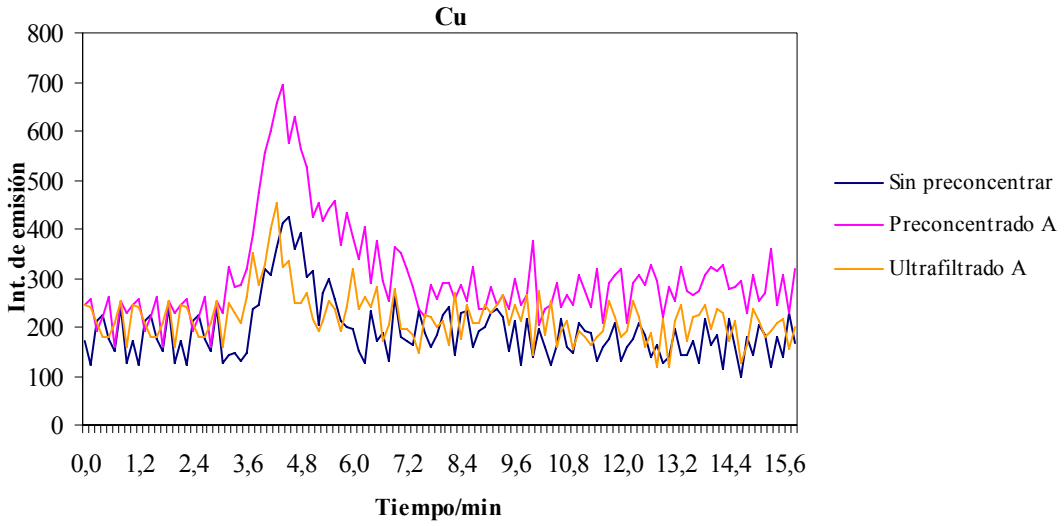


Figura 5.31: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu para tubos de ultrafiltración nuevos (tubos A y B)

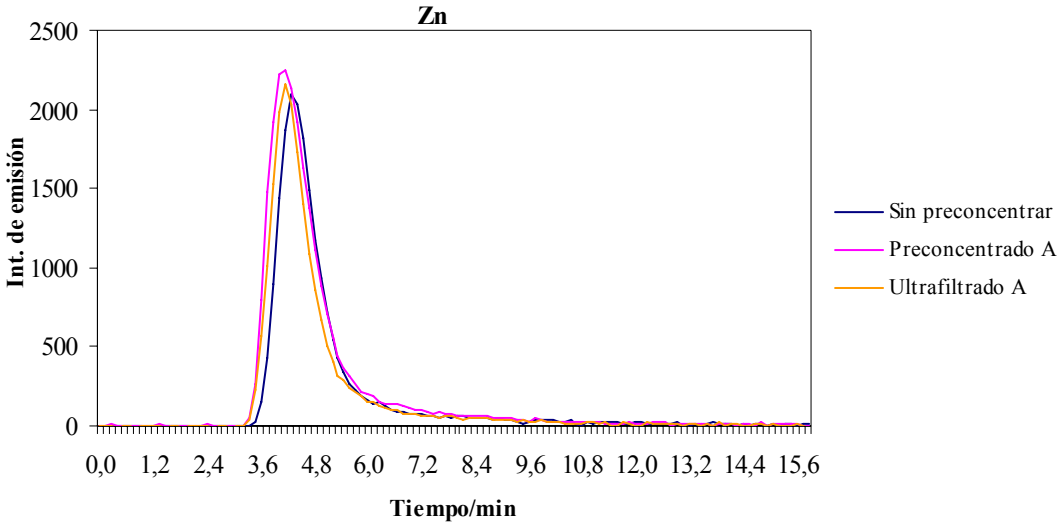


Figura 5.32: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn para tubos de ultrafiltración nuevos (tubos Ay B)

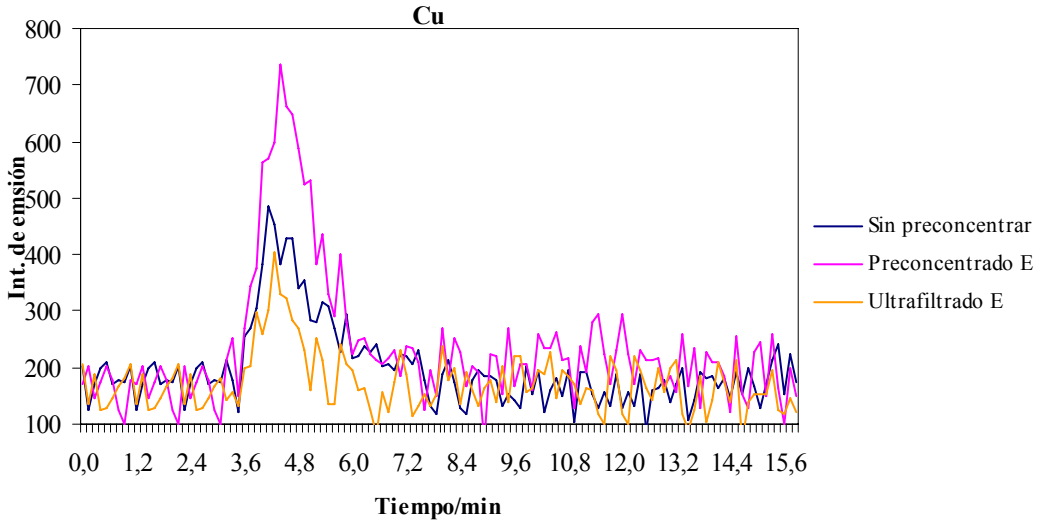


Figura 5.33: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu para tubos de ultrafiltración usados (tubos E y F

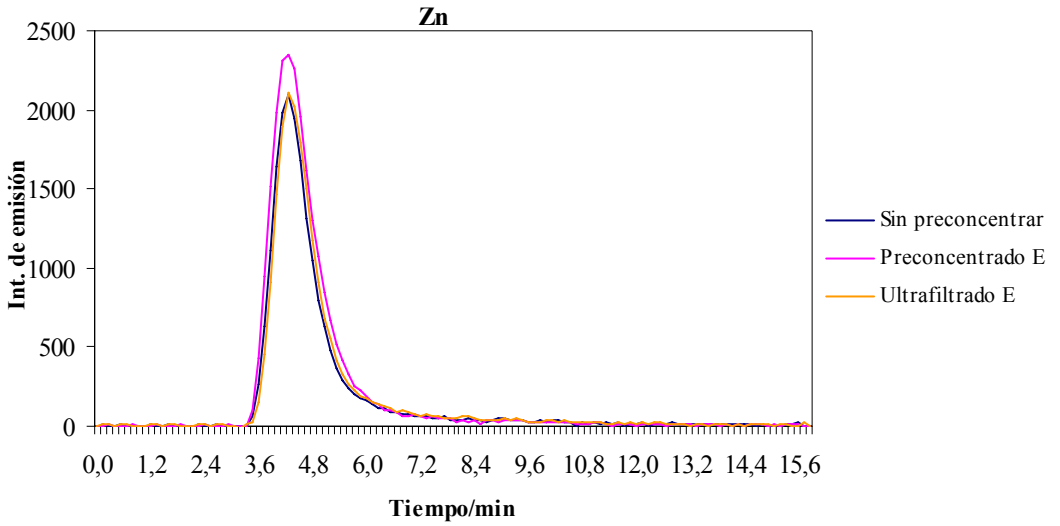


Figura 5.34: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn para tubos de ultrafiltración usados (tubos E y F)

Como puede verse en las anteriores figuras, existe cierta cantidad de MLP en los ultrafiltrados, menos evidente para la fracción de Cu ligada a MLPs, pero importante para el caso de la fracción de Zn-MLPs. Este resultado puede deberse a que aún no se han optimizado ninguna de las variables que intervienen en el proceso de ultrafiltración por centrifugación.

Por otro lado se comprueba que se pueden reutilizar los tubos pues las señales obtenidas para los metales en el caso de tubos usados (E y F) son las mismas que se obtienen cuando se utilizan tubos nuevos.

En el caso del estudio de las interferencias metálicas, comparación tubos A y B con tubos C y D (**figuras 5.35** y **5.36**), vemos que no existen contaminaciones previas de los filtros y de los tubos por metales ya que no se obtiene señal alguna al analizar la disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM empleada en el proceso previo de limpieza-acondicionamiento (tubos C y D).

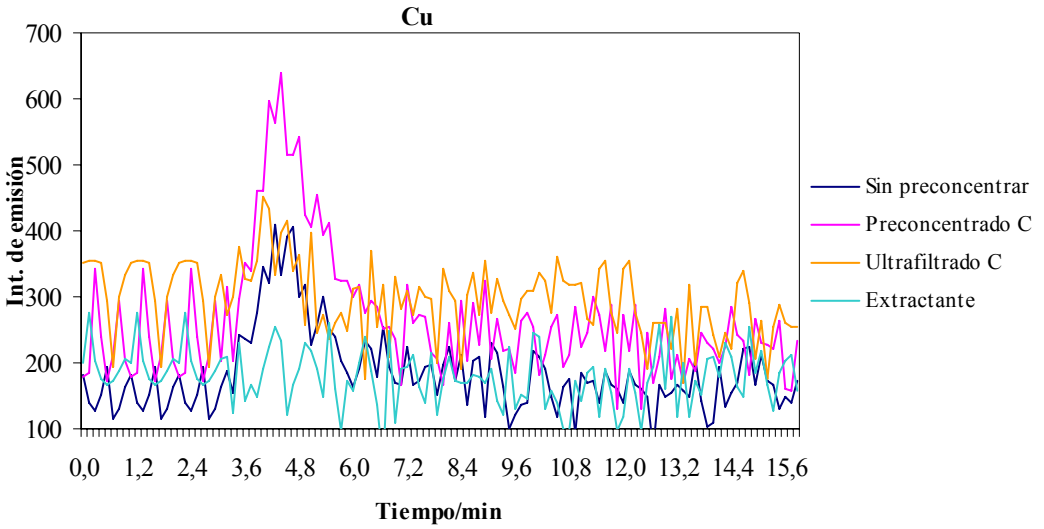


Figura 5.35: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu en el estudio de las interferencias metálicas

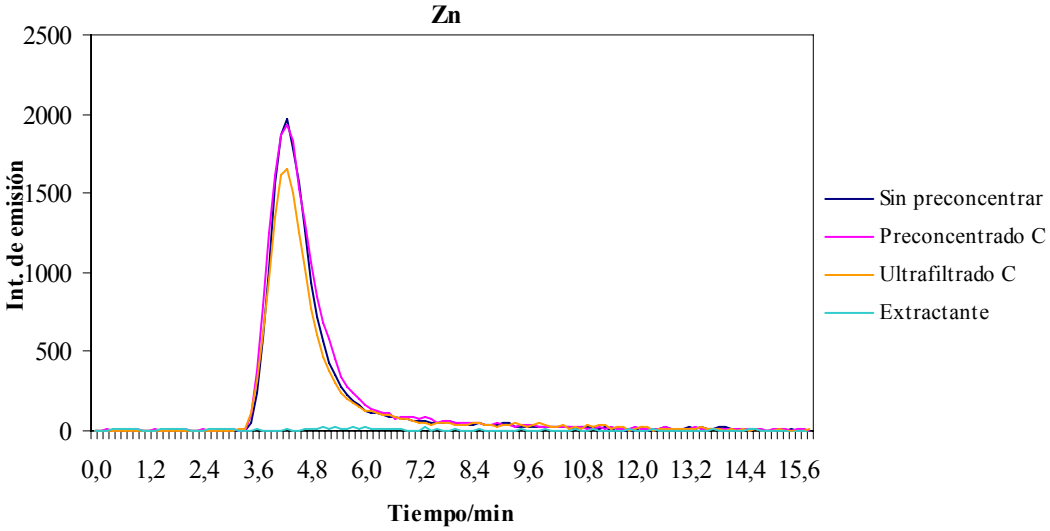


Figura 5.36: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn en el estudio de las interferencias metálicas

Por último, cabe destacar que en cuanto a la reproducibilidad entre las medidas, ésta es buena tanto entre réplicas de un mismo experimento como entre réplicas de un mismo preconcentrado o ultrafiltrado analizado. Estas afirmaciones se deducen de los cromatogramas mostrados en las **figuras 5.37** y 5.**38.**

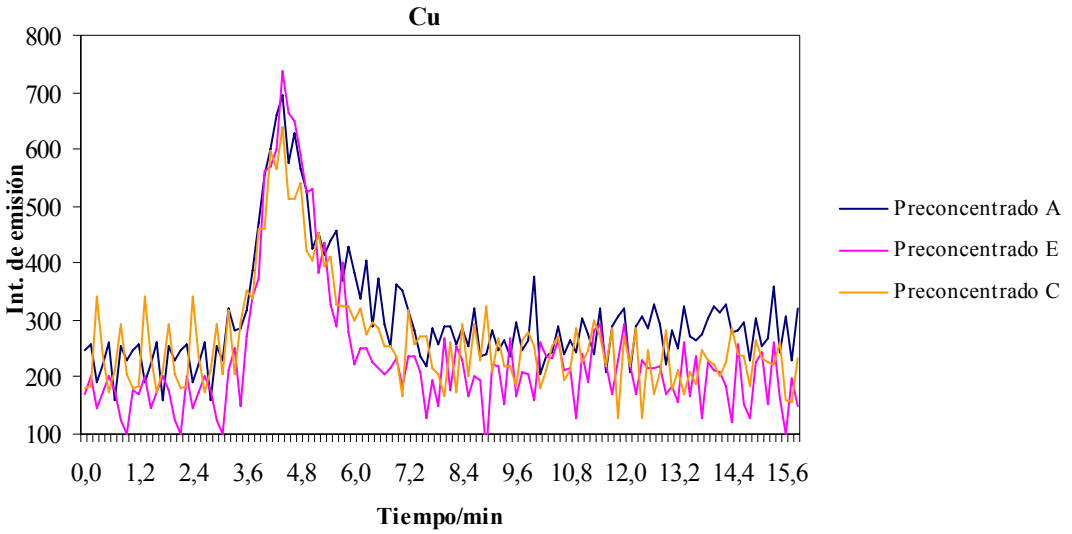


Figura 5.37: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu en cada preconcentrado

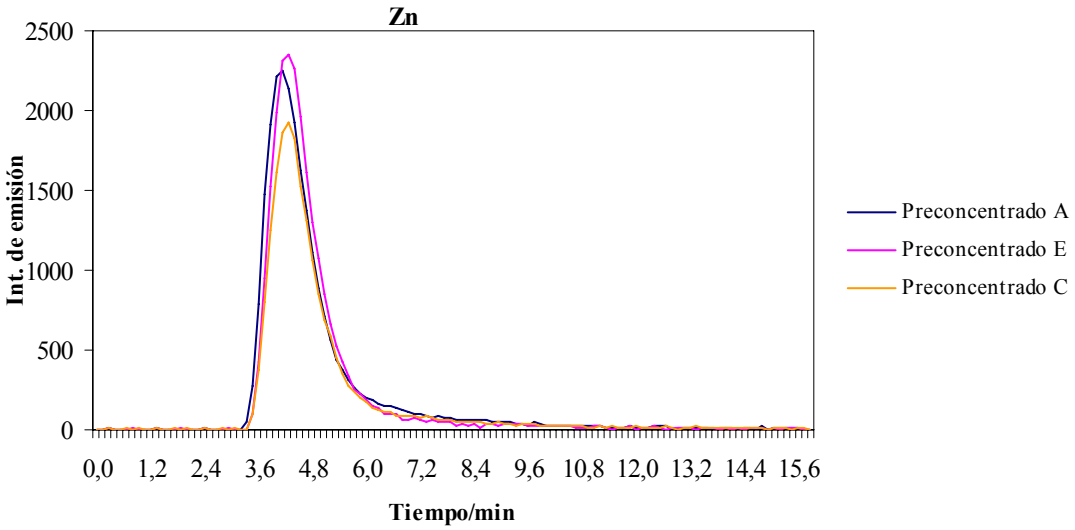


Figura 5.38: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn en cada preconcentrado

3.5.1.2- ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN

El siguiente paso fue estudiar como influía la variable velocidad de centrifugación en el proceso de preconcentración por ultrafiltración por exclusión molecular. El estudio se realizó para velocidades de centrifugación de 4000xg, 2000xg y 1400xg, y manteniendo constante el tiempo de centrifugación en 40 min. Cada experimento se realizó por duplicado, con tubos de ultrafiltración nuevos y adicionando a cada tubo 15 ml de extracto citosólico de mejillón. Los preconcentrados, llevados a 5 ml con el extractante TRIS-HCl 10-10 mM, los ultrafiltrados y los extractos sin preconcentrar se analizaron en el sistema HPLC-ICP-OES *on line* en las condiciones operacionales de las **tablas 5.20** y **5.21**.

En las **figuras 5.39** a **5.44** se muestran los cromatogramas superpuestos para el Cu y el Zn del preconcentrado, del ultrafiltrado y del extracto citosólico sin preconcentrar en función de la velocidad de centrifugación. De forma similar, en las **figuras 5.45** y **5.46** se muestran superpuestos los cromatogramas para las líneas Cu y Zn de los preconcentrados en base a la velocidad de centrifugación.

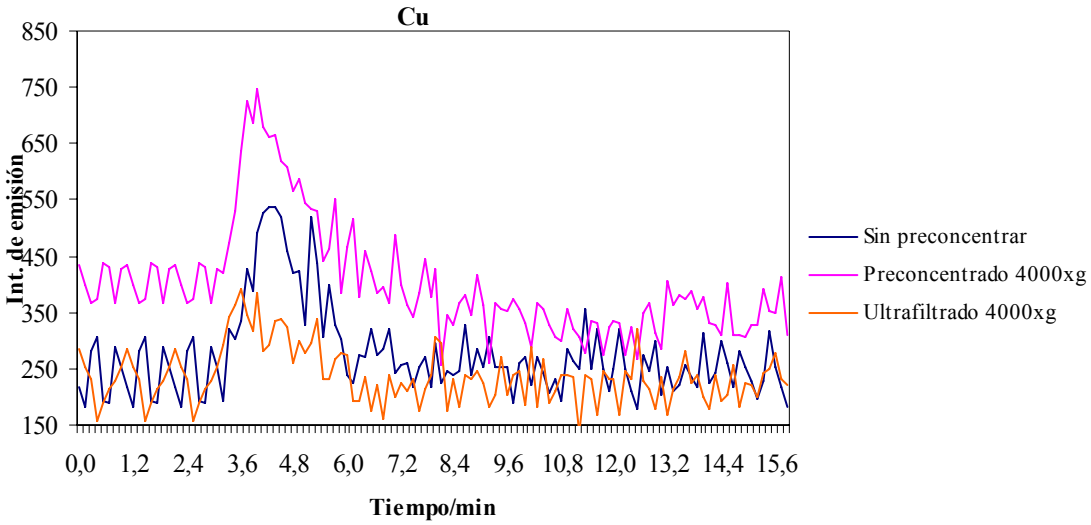


Figura 5.39: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu para una velocidad de centrifugación de 4000xg

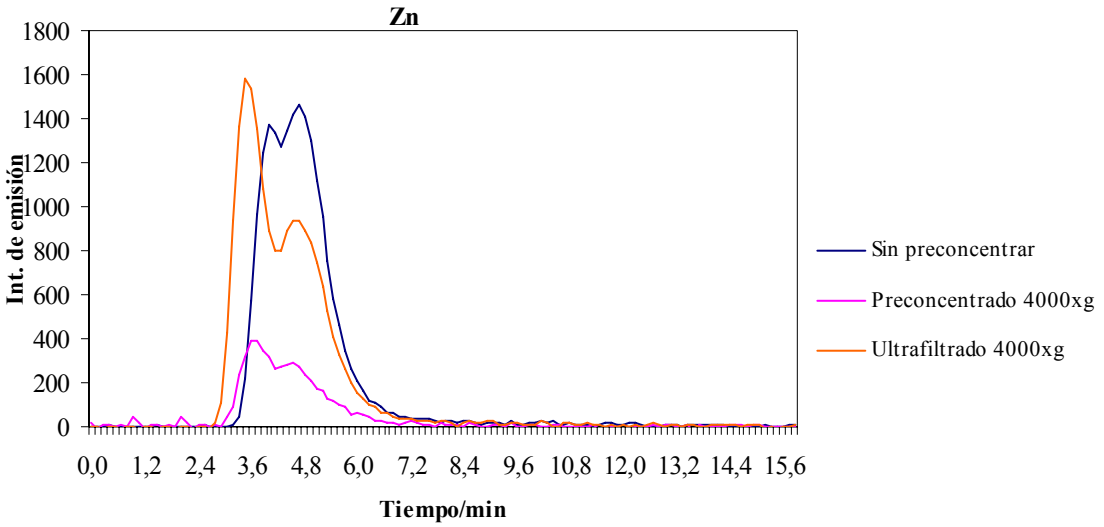


Figura 5.40: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn para una velocidad de centrifugación de 4000xg

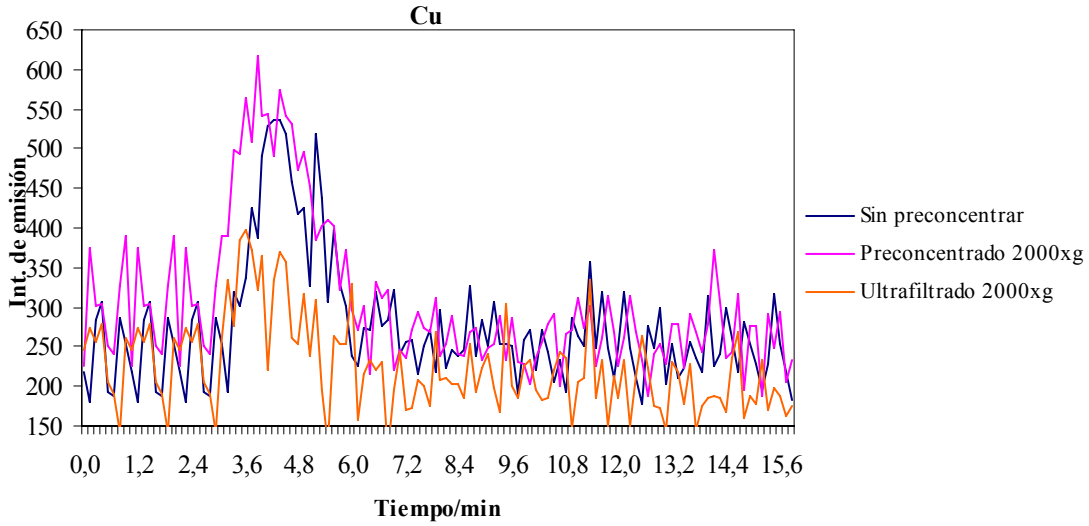


Figura 5.41: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu para una velocidad de centrifugación de 2000xg

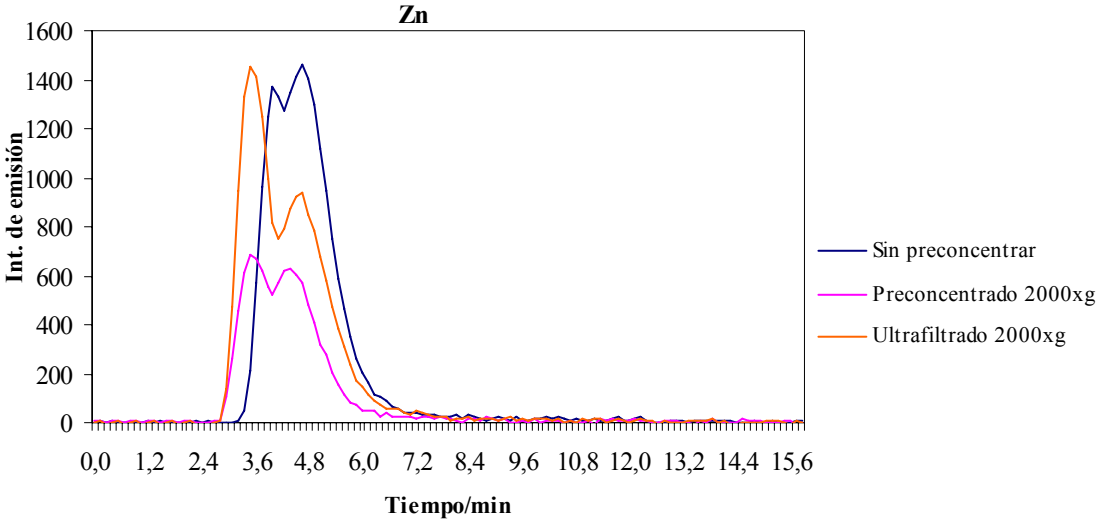


Figura 5.42: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn para una velocidad de centrifugación de 2000xg

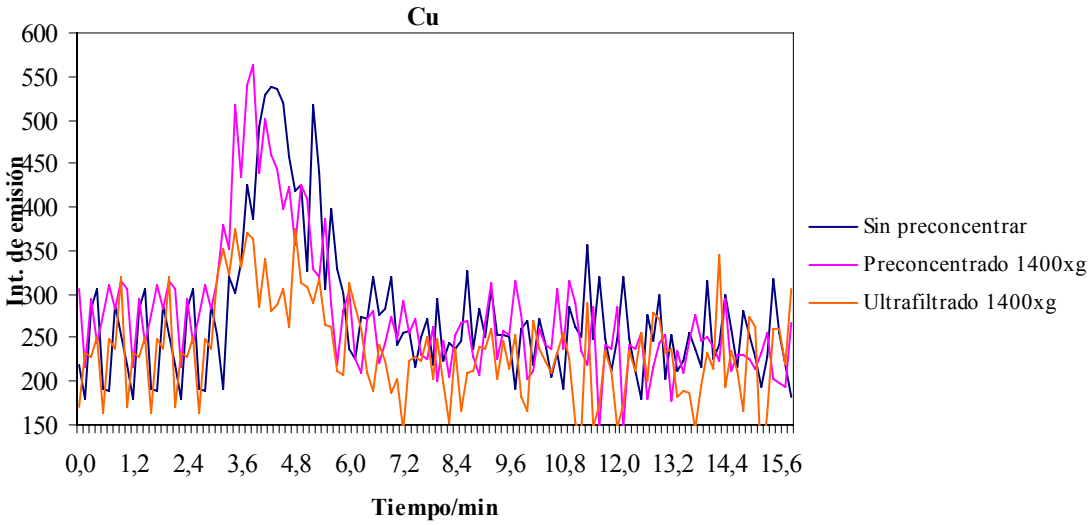


Figura 5.43: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu para una velocidad de centrifugación de 1400xg

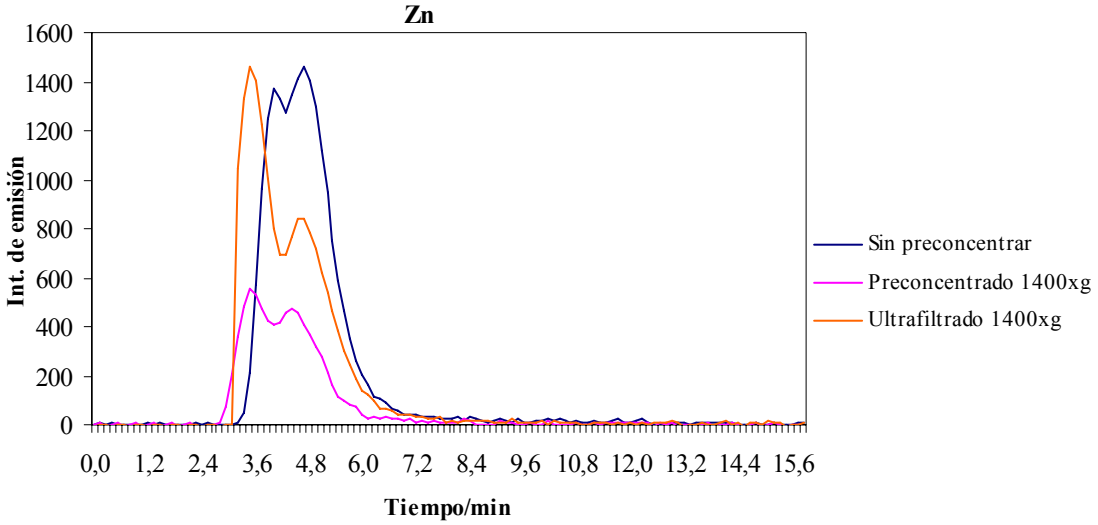


Figura 5.44: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn para una velocidad de centrifugación de 1400xg

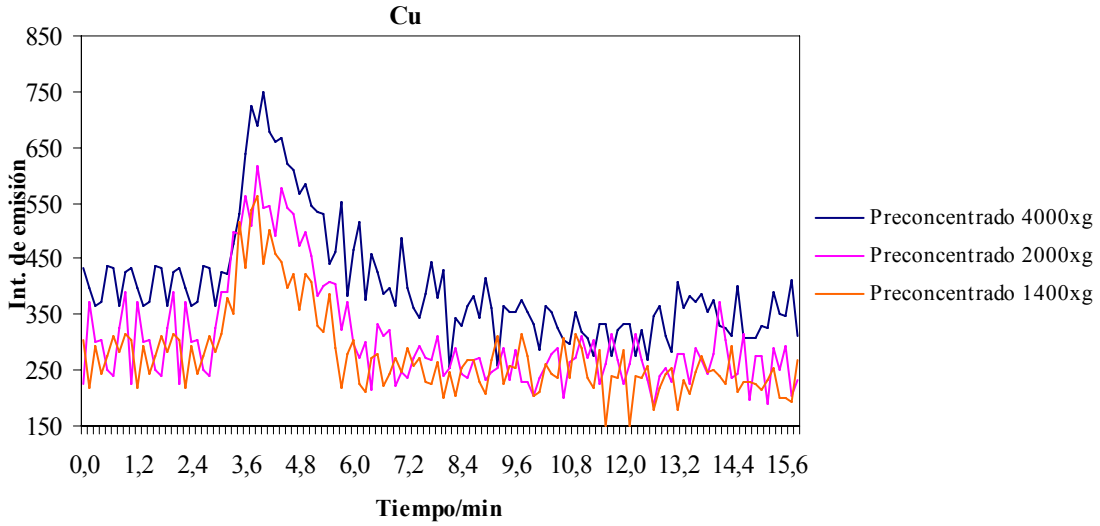


Figura 5.45: Superposición de los cromatogramas para la línea del Cu en función de la velocidad de centrifugación

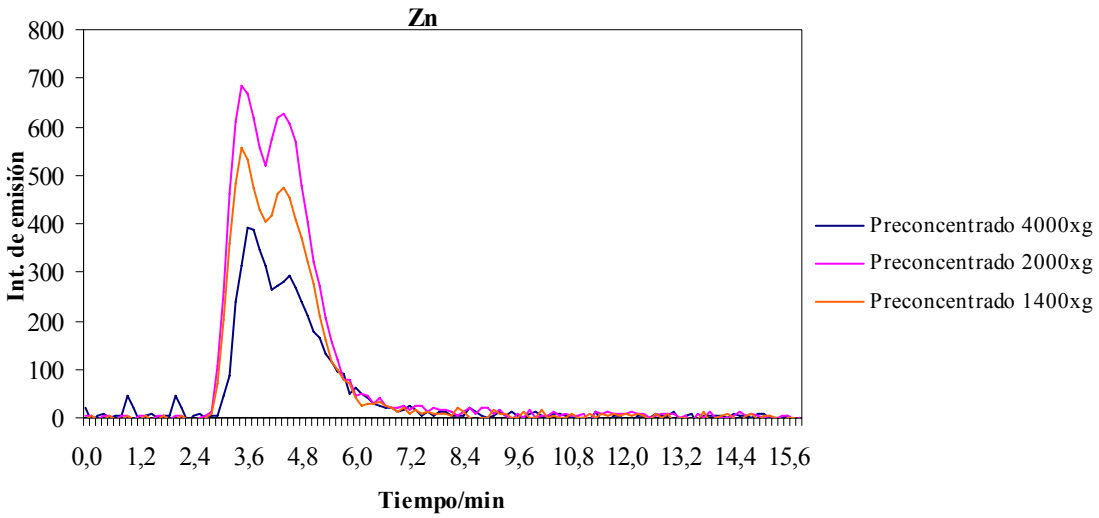


Figura 5.46: Superposición de los cromatogramas para la línea del Zn en función de la velocidad de centrifugación

A la vista de los resultados se puede concluir que este tipo de preconcentración tampoco funciona ya que parte de las MLPs atraviesan la membrana de corte y se encuentran en el ultrafiltrado (señales para el preconcentrado y el extracto sin preconcentrar iguales o inferiores en el preconcentrado). Este resultado se ha obtenido tanto para los metales Cu y Zn, como para los restantes elementos investigados (Fe, Ba y Sr) y está en concordancia con el hecho de que a mayor velocidad de centrifugación mayor cantidad de MLP que atraviesa la membrana de corte, disminuyendo así su concentración en el preconcentrado. La explicación de este hecho puede deberse a la naturaleza de las MLPs. Como ya se ha comentado, las MLPs (y también las MTs) son proteínas no globulares, es decir, que carecen de estructura terciaria, por lo que podrían atravesar la membrana de corte aunque el peso molecular nominal de ésta fuese inferior al tamaño molecular de las MLPs.

3.6- ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN DE MLPs DE MEJILLÓN POR LIOFILIZACIÓN

El último procedimiento de preconcentración estudiado fue el de liofilización que consiste en la eliminación del agua (disolvente) por sublimación a baja presión. Para volúmenes de extracto citosólico de 25 ml y operando a -40 ºC, se consigue la eliminación total del agua en un periodo de 1 semana. Una vez liofilizado, el residuo del extracto citosólico se redisuelve en un volumen mínimo de disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM y los metales ligados a las MLPs se determinan por HPLC-ICP-OES *on line* (estudio de la distribución metálica) y *off line* (determinación de la concentración metálica).

Las primeras pruebas consistieron en estudiar en qué volumen era más adecuado redisolver el liofilizado. Se cogieron, así, dos extractos liofilizados y se redisolvieron en 1 ml y en 2 ml de disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM y se analizaron por HPLC-ICP-OES *on line* en las condiciones recogidas en las **tablas 5.20** y **5.21**. Los cromatogramas obtenidos monitorizando las líneas de algunos metales, se muestran en las **figuras 5.47** a **5.51**.

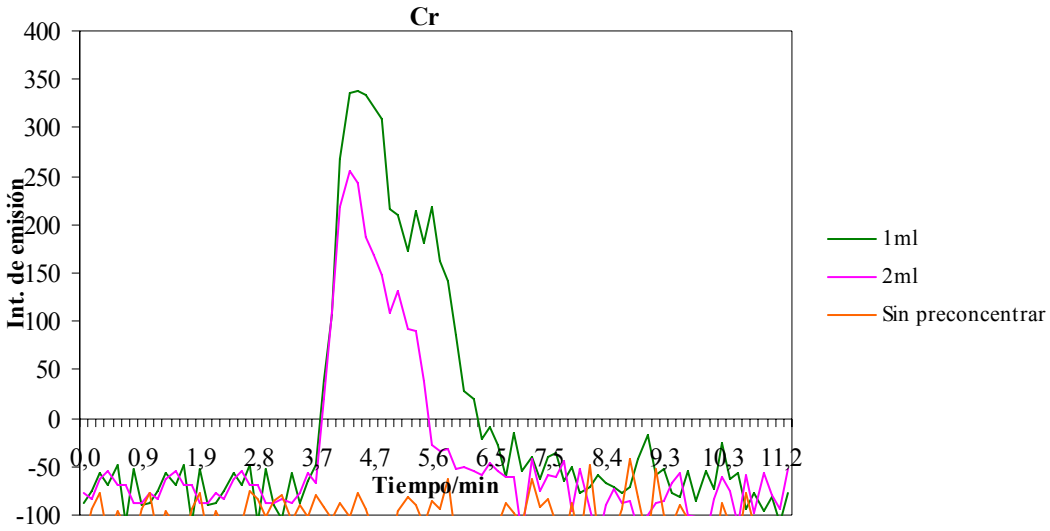


Figura 5.47: Cromatogramas para la línea del Cr en extractos liofilizados redisueltos en 1 y 2 ml y en el extracto citosólico sin preconcentrar

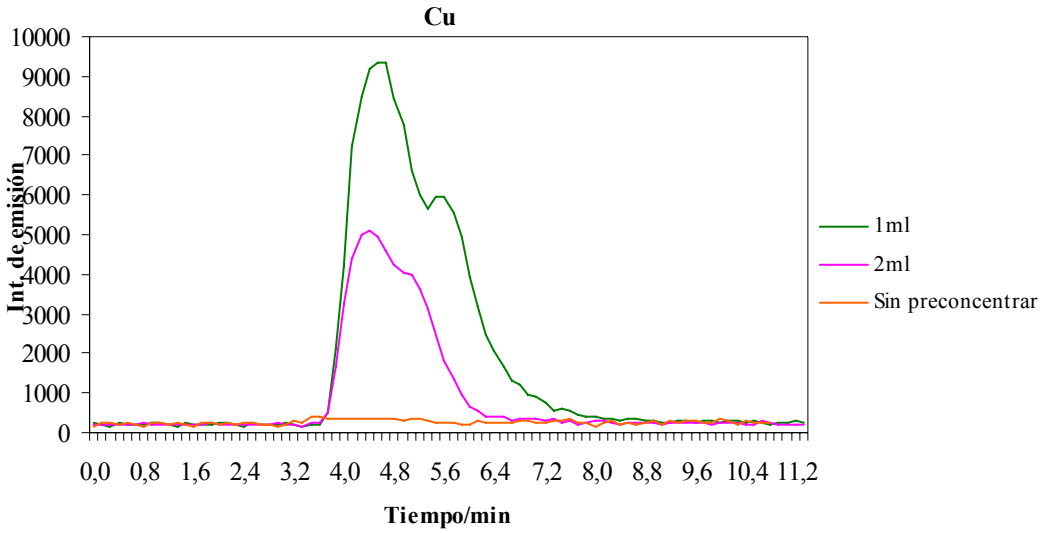


Figura 5.48: Cromatogramas para la línea del Cu en extractos liofilizados redisueltos en 1 y 2 ml y en el extracto citosólico sin preconcentrar

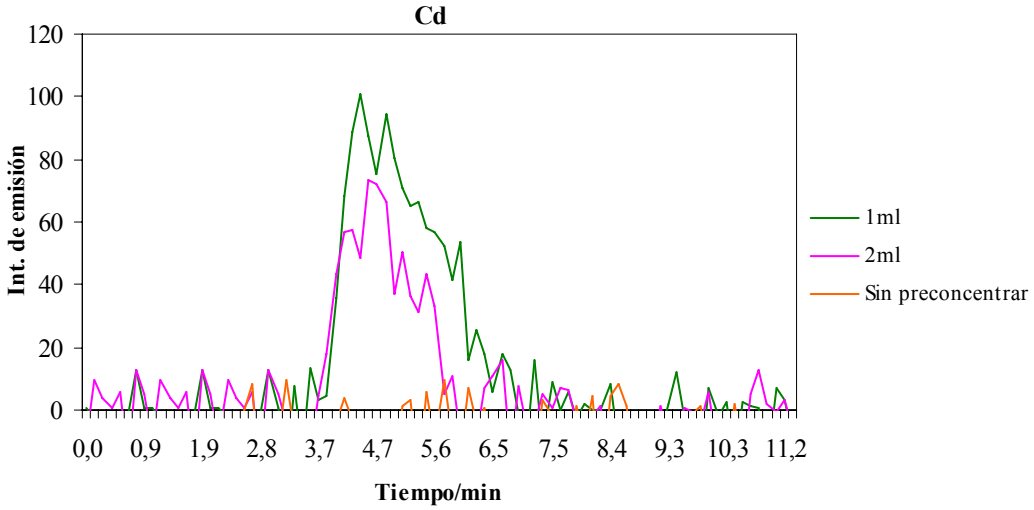


Figura 5.49: Cromatogramas para la línea del Cd en extractos liofilizados redisueltos en 1 y 2 ml y en el extracto citosólicos sin preconcentrar

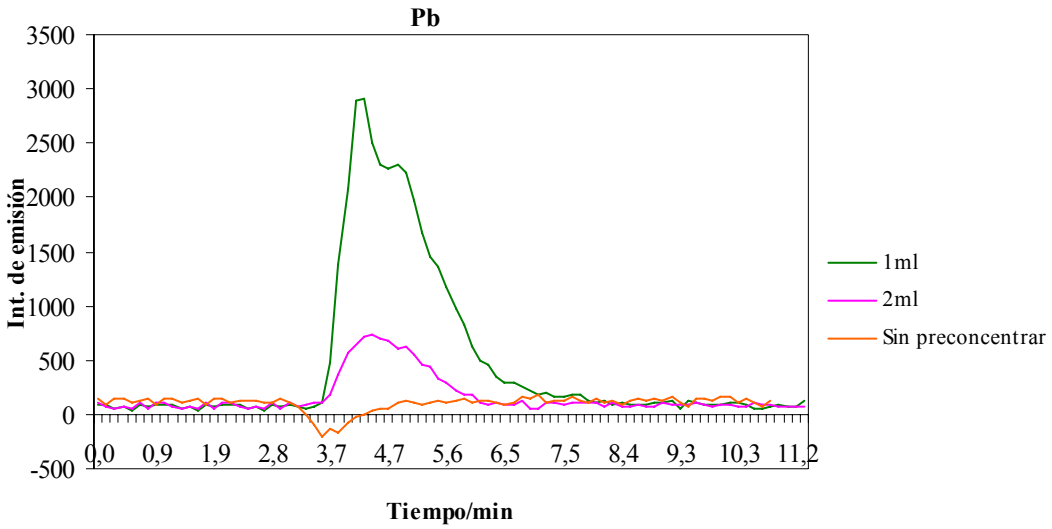


Figura 5.50: Cromatogramas para la línea del Pb en extractos liofilizados redisueltos en 1 y 2 ml y en el extracto citosólico sin preconcentrar

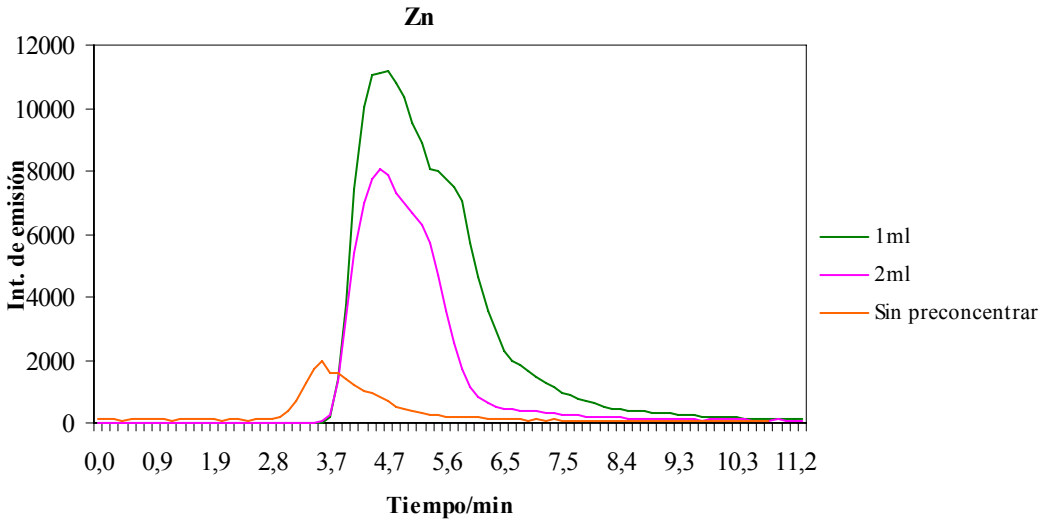


Figura 5.51: Cromatogramas para la línea del Zn en extractos liofilizados redisueltos en 1 y 2 ml y en el extracto citosólico sin preconcentrar

Como se puede ver en las figuras anteriores, se obtiene señales importantes para elementos asociados a MLPs tales como Cd, Pb y Cr. Además, el volumen más adecuado para redisolver el preconcentrado es el de 1 ml (factor de preconcentración 25) porque la señal es mayor, si bien, también se puede utilizar un volumen de 2 ml (factor de preconcentración 12,5).

3.6.1- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN LA SEPARACIÓN PREPARATIVA DE MLPs EN PRECONCENTRADOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN

Dada la gran capacidad de preconcentración que implica el empleo del proceso de liofilización, la cantidad de MLP introducida en la columna cromatográfica es mucho mayor que en los estudios anteriores por lo que parece lógico reevaluar las condiciones de separación cromatográfica. Por otra parte, tal y como se observa en los cromatogramas de las **figuras 5.47** a **5.51**, la gran cantidad de proteína introducida hace que se pierda resolución en la separación de las dos isoformas MLP-I y MLP-II. En este sentido, hablaremos en lo sucesivo de cromatografía preparativa, ya que ambas isoformas preconcentradas coeluyen.

En la reoptimización de la concentración de fase móvil TRIS-HCl se ensayaron concentraciones de 2, 10, 75, 100 y 250 mM. Para la optimización se partió de un pool de extractos citosólicos liofilizados y redisueltos en 1 ml de disolución reguladora TRIS-HCl 10-10 mM. Cada concentración de fase móvil se ensayó por duplicado. El resto de las condiciones de medida por HPLC-ICP-OES *on line* son las recogidas en las **tablas 5.20 y 5.21**.

En las **figuras 5.52** a **5.56** podemos ver los cromatogramas superpuestos obtenidos para algunos de los metales determinados según la concentración de fase móvil utilizada.

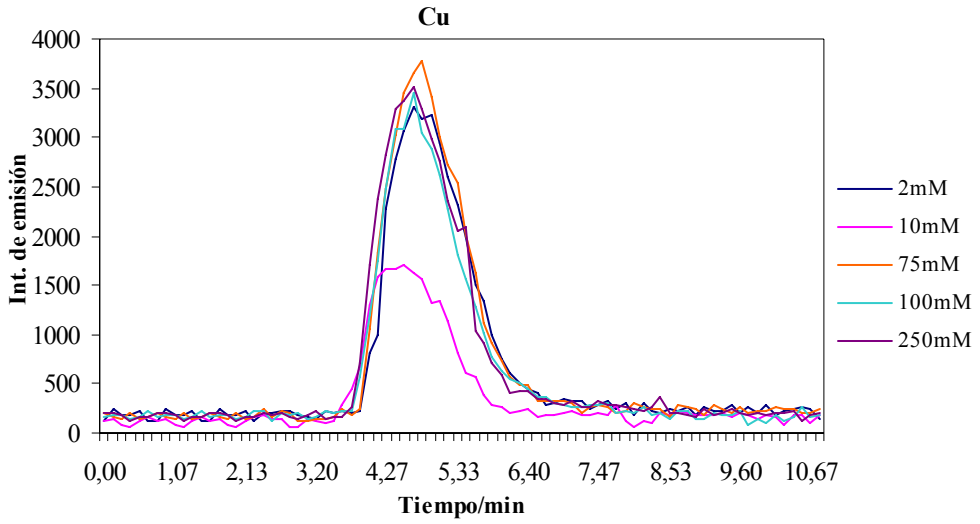


Figura 5.52: Superposición de cromatogramas para la línea del Cu en extractos citosólicos liofilizados en función de la concentración de fase móvil

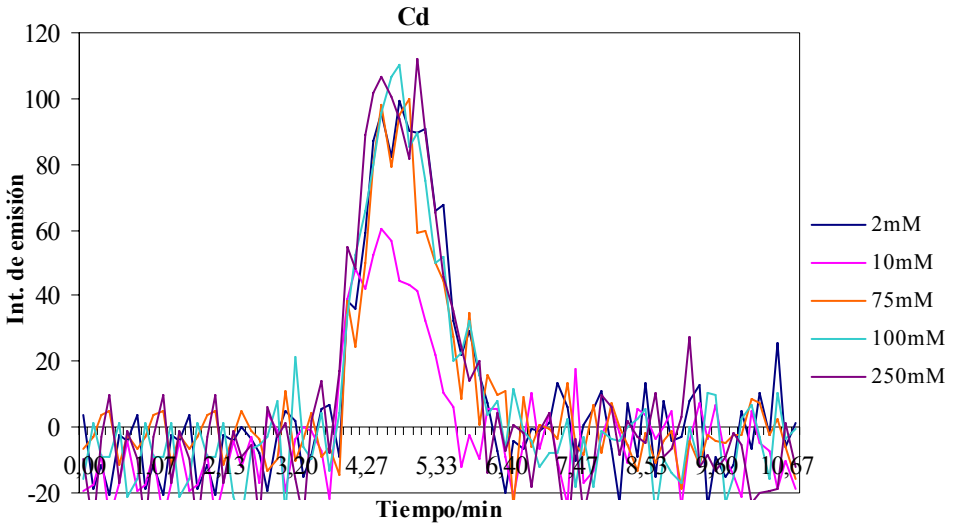


Figura 5.53: Superposición de cromatogramas para la línea del Cd en extractos citosólicos liofilizados en función de la concentración de fase móvil

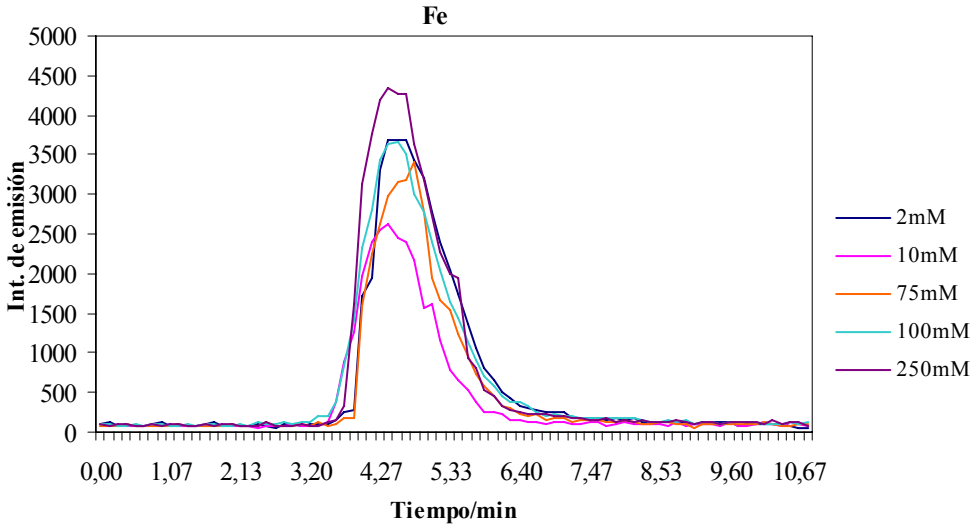


Figura 5.54: Superposición de cromatogramas para la línea del Fe en extractos citosólicos liofilizados en función de la concentración de fase móvil

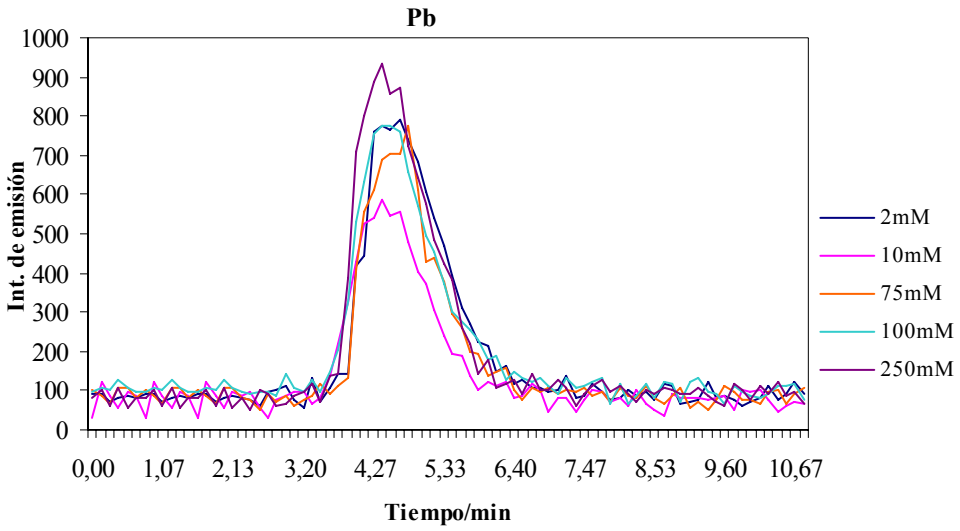


Figura 5.55: Superposición de cromatogramas para la línea del Pb en extractos citosólicos liofilizados en función de la concentración de fase móvil

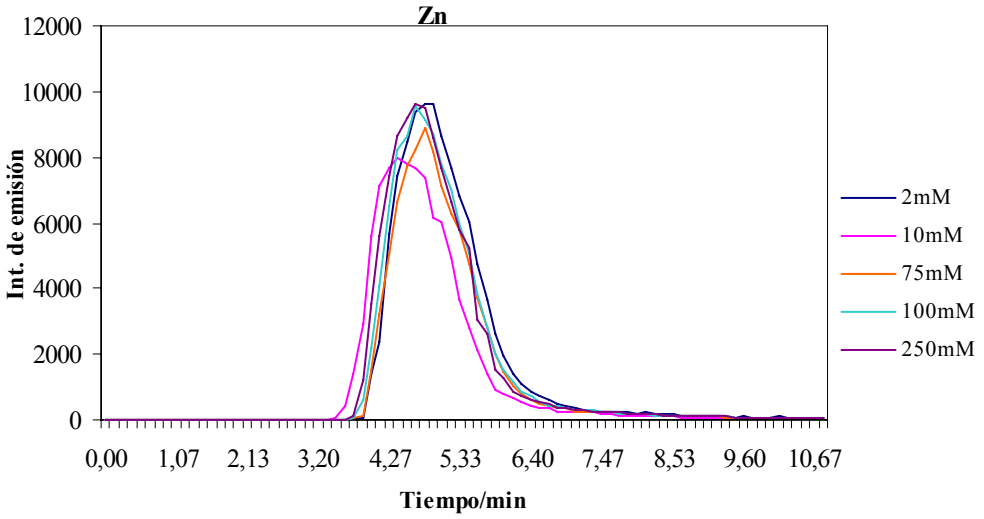


Figura 5.56: Superposición de cromatogramas para la línea del Zn en extractos citosólicos liofilizados en función de la concentración de fase móvil

Como puede observarse, el efecto de la concentración de fase móvil no afecta significativamente a la resolución entre las dos isoformas de MLPs. Esto es así ya que, como se ha

comentado, la gran cantidad de proteína introducida en la columna hace que ambas isoformas coeluyan. En estudios sucesivos, se empleará como fase móvil una disolución reguladora TRIS-HCl 250-250 mM a pH 7,4.

3.6.2- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD, EFECTO MATRIZ, LOD Y LOQ DEL MÉTODO PARA PRECONCENTRADOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN POR HPLC-ICP-OES off line

Para el estudio de la linealidad y del posible efecto matriz en las determinaciones por HPLC-ICP-OES *off line* se prepararó una curva de calibración acuosa, una curva de calibrado en fase móvil TRIS-HCl 250-250 mM, y una recta de adición estándar. Para la obtención de la recta de adición se cromatografió repetidas veces un pool de extractos liofilizados y redisueltos en extractante y se recogieron las fracciones correspondientes a las MLPs. La mezcla de todas estas fracciones se empleó para preparar los distintos puntos de la recta de adición, empleando 4 ml de dicha mezcla y diluyendo la disolución patrón a 5 ml tras adicionar el correspondiente volúmen de patrón multielemental. Las condiciones operacionales de medida se resumen en las **tablas 5.22** y **5.23**.

Tabla 5.22: Condiciones operacionales de medida para HPLC-ICP-OES *off line*

Condiciones operacionales HPLC	
Volumen de inyección/µl	200
Flujo/(ml/min)	0,8
Composición de la Fase Móvil	TRIS-HCl 250-250 mM, pH 7,4
Tipo de Columna	Protein Pak DEAE-5PW
Modo de Elución	Isocrático
Condiciones operacionales ICP-OES	
Potencia de Radiofrecuencias/W	1300
Flujos de los Gases/(l/min)	
Gas de Nebulización	0,85
Gas Auxiliar	1,0
Gas plasmógeno	15,0
Tipo de Nebulizador	GemCone (Cámara Ciclónica)
Flujo de muestra/ml min^{-1}	1,5, 0,8 [a]
Tiempo de estabilización/s	45, 90 [a]
Número de réplicas	4, 120 [a]
Disposición de medida	Axial

[a] Condiciones operacionales de medida para HPLC-ICP-OES *on line*

Tabla 5.23: Elementos y líneas de detección en ICP-OES

Elemento	Líneas de emisión
Al	308,215, 394,403, 396,162
As	180,982, 193,695, 197,202
Ba	233,527, 455,422
Cd	214,437, 226,508, 228,805
Cr	205,564, 267,711, 283,563
Cu	224,700, 324,756
Fe	238,204, 239,574
Mn	257,610, 259,374, 260,571
Ni	221,650, 231,606, 232,007
Pb	217,000, 220,356, 261,392
Rb	420,074, 780,880
Sr	421,560
Zn	202,534, 206,200, 213, 859

Las concentraciones de los distintos metales determinados correspondientes a los distintos niveles de calibración se resumen en la **tabla 5.24**.

Tabla 5.24: Niveles de concentración en las rectas de calibrado y adición

Patrón Nº	[ ] Patrón/µg/ml	Elementos
1	0	Ba, Sr
	0	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn, Co, Si, Se
	0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
2	0,025	Ba, Sr
	0,25	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn, Co, Si, Se
	1,25	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
3	0,05	Ba, Sr
	0,5	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn, Co, Si, Se
	2,5	Al, Fe,Cu, Zn, Mn
4	0,1	Ba, Sr
	1,0	As, Sb, Cd, Cr, Pb, Ni, V, Sn, Co, Si, Se
	5,0	Al, Fe,Cu, Zn, Mn

En las **figuras 5.57** a **5.59** podemos observar las rectas de calibrado acuoso, calibrado en fase móvil y adición estándar para los metales Cu, Mn y Zn. Como puede verse, existe una

relación lineal entre la concentración y la señal de emisión. En este caso, además, se ve que las pendientes de las rectas de calibrado y adición estándar son diferentes, lo que implica la existencia de cierto efecto matriz en las determinaciones. El efecto matriz observado para todos los elementos estudiados se atribuye, por una parte a la mayor cantidad de proteína (matriz) introducida en el plasma tras el proceso de liofilización y, además, a la gran cantidad de sales presentes en el extracto liofilizado y redisuelto.

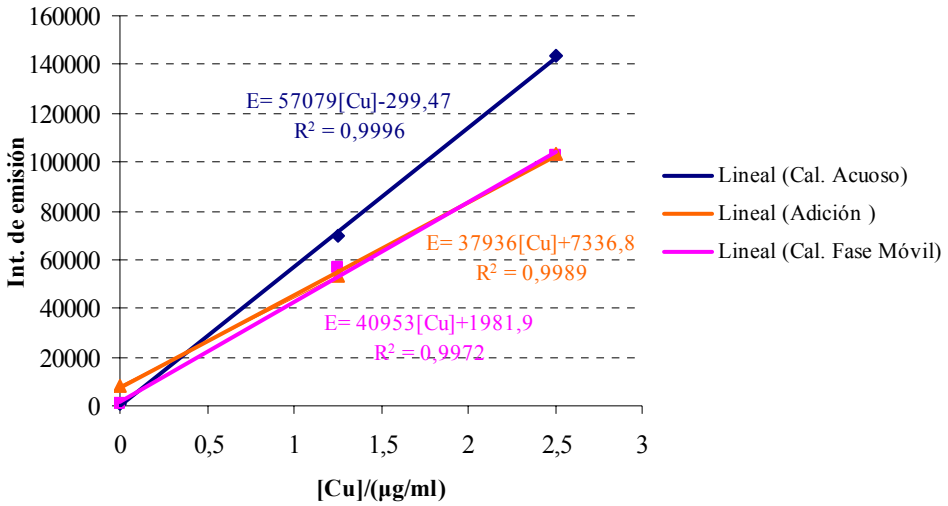


Figura 5.57: Rectas de calibrado acuoso, calibrado en fase móvil y adición estándar para Cu

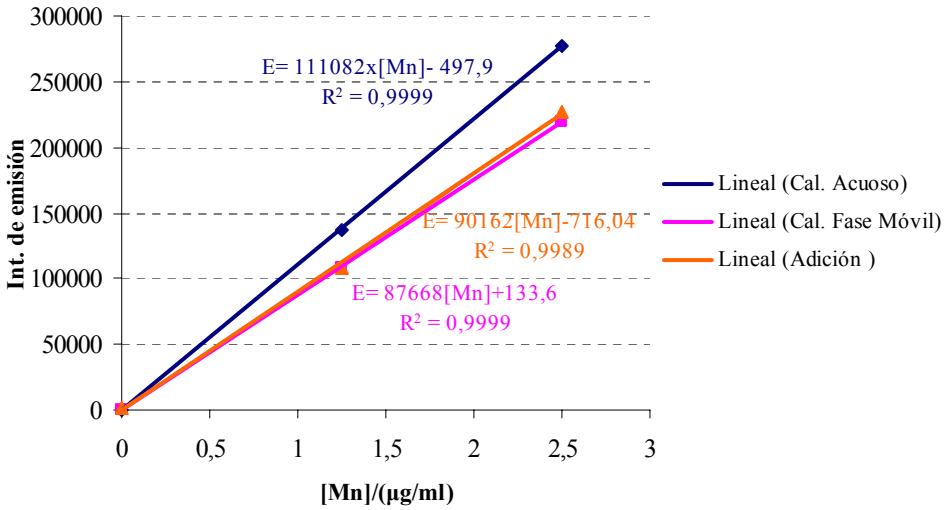


Figura 5.58: Rectas de calibrado acuoso, calibrado en fase móvil y adición estándar para Mn

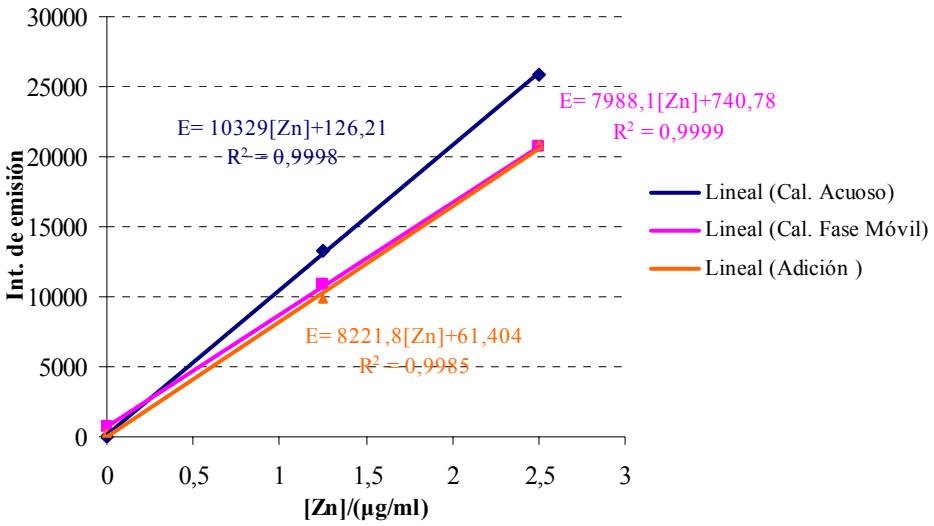


Figura 5.59: Rectas de calibrado acuoso, calibrado en fase móvil y adición estándar para Zn

Para el cálculo de los LODs y LOQs para los elementos ligados a MLPs se emplearon las ecuaciones expuestas en el Capítulo I de la presente memoria pero, en este caso, el valor de la pendiente empleado fue la pendiente de la recta de adición estándar en cada caso. Los valores de LOD y LOQ calculados y referidos a masa húmeda de mejillón se recogen en la **tabla 5.25**.

Tabla 5.25: LOD y LOQ, expresados en masa de mejillón húmedo, para metales asociados a MLPs

Elemento	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
Al	0,002	0,005
As	0,007	0,022
Ba	0,0001	0,0003
Cd	0,0003	0,001
Cr	0,0003	0,001
Cu	0,009	0,030
Fe	0,001	0,003
Mn	0,0002	0,001
Ni	0,001	0,003
Pb	0,0004	0,001
Sr	0,0001	0,0002
V	0,006	0,021
Zn	0,002	0,007

3.6.3- ESTUDIO DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA PRECONCENTRADOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN POR HPLC-ICP-OES off line

Para calcular la precisión del proceso de determinación HPLC-ICP-OES *off line* se prepararon siete extractos a partir de un mismo pool de mejillón húmedo y cada extracto se liofilizó y redisolvió en 1 ml de extractante. Cada liofilizado se analizó por duplicado en HPLC y las fracciones recogidas se analizan por ICP-OES según condiciones óptimas (**tablas 5.22** y **5.23)**. Los resultados de precisión expresados como coeficiente de variación (CV) se muestran en la **tabla 5.26**.

Tabla 5.26: Coeficientes de variación en HPLC-ICP-OES *off line*

Elemento	CV/%
Al	36
As	14
Ba	15
Cr	20
Fe	15
Mn	27
Ni	25
Pb	16
Sr	21
V	22
Zn	29

Como puede verse, los resultados de precisión son bastante satisfactorios teniendo en cuenta todo el proceso de preparación del extracto citosólico, preconcentración, cromatografía preparativa y determinación llevado a cabo.

3.6.4- ESTUDIO DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA PRECONCENTRADOS CITOSÓLICOS DE MEJILLÓN POR HPLC-ICP-OES on line

Para el estudio de la precisión del método HPLC-ICP-OES *on line* para preconcentrados de extractos citosólicos por liofilización se inyectó un extracto liofilizado redisuelto en 2 ml de extractante 7 veces, registrando el perfil metálico por HPLC-ICP-OES *on line* en las condiciones recogidas en las **tablas 5.22** y **5.23**.

A modo de resumen, las **tablas 5.27** y **5.28** listan los valores para el coeficiente de variación referidos a la medida de tiempo de retención y de altura de pico.

Tabla 5.27: Coeficientes de variación en la determinación del tiempo de retención para preconcentrados citosólicos por liofilización

Elemento	CV t_r/%	Elemento	CV t_r/%
Ba	4	***Mn***	1
Cd	3	***Pb***	3
Cu	5	***V***	2
Fe	3	***Zn***	3
Ni	3	-	

Tabla 5.28: Coeficientes de variación en la determinación del área de pico para preconcentrados citosólicos por liofilización

Elemento	CV Altura de pico/%	Elemento	CV Altura de pico/%
Ba	13	***Mn***	22
Cd	31	***Pb***	13
Cu	21	***V***	31
Fe	18	***Zn***	24
Ni	3	-	

Como puede verse, existe una buena precisión en el tiempo de retención así como para la medida de área de pico en el proceso HPLC-ICP-OES *on li*ne.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han sometido a estudio tres métodos de preconcentración distintos, el primero basado en el fenómeno de extracción en fase sólida con soportes C_{18}, el segundo basado en la ultrafiltración por exclusión de tamaños, y el último, basado en la liofilización del extracto citosólico.

La preconcentración empleando SPE con soportes C_{18} dio como resultado una aceptable preconcentración de ambas isoformas, especialmente de la isoforma minoritaria MLP-II. Sin embargo, las uniones metal-proteína se rompen durante el proceso de interacción entre los complejos metal-MLPs y el soporte C_{18}. Por este motivo, y dado que nuestro objetivo es la determinación del metal asociado a las isoformas de MLPs, el procedimiento de preconcentración SPE en fase reversa se descarta.

En cuanto al segundo método probado, basado en los tubos para ultrafiltración por exclusión de tamaños, si bien se consigue preconcentrar los complejos metal-MLPs, parte de las MLPs atraviesan la membrana de corte molecular debido, posiblemente, a la naturaleza no globular de las MLPs. Por este motivo, este procedimiento de preconcentración también fue desechado.

El proceso de preconcentración basado en la liofilización del extracto citosólico y redisolución de éste en un volumen mínimo de extractante ofrece resultados satisfactorios en cuanto a LOD, LOQ y precisión para mucho de los metales asociados a las MLPs. Sin embargo, dada la gran cantidad de proteína preconcentrada, el procedimiento de separación cromatográfico pierde la resolución entre las dos isoformas de MLPs, por lo que tenemos que hablar en este caso de cromatografía preparativa y de determinación de metales asociados a MLPs y no a la isoformas MLP-I y MLP-II.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *"On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis"*. Electrophoresis, 2000, 21, 2768-2779.

[2] T. Stroink, E. Paarlberg, J. C. M. Waterval, A. Bult, W. J. M. Underberg, *"On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis, focused on the determination of proteins and peptides"*. Electrophoresis, 2001, 22, 2374-2383.

[3] R. Zhang, S. Hjertén, *"A micromethod for concentration and desalting utilizing a hollow fiber, with special reference to capillary electrophoresis"*. Analytical Chemistry, 1997, 69, 1585-1592.

[4] X. Z. Wu, A. Hosaka, T. Hobo, *"An on-line electrophoretic concentration method for capillary electrophoresis of proteins"*. Analytical Chemistry, 1998, 70, 2081-2084.

[5] E. Bonneil, K. C. Waldron, *"Characterization of solid-phase extraction device for discontinuous on-line preconcentration in capillary electrophoresis-based peptide mapping"*. Journal of Chromatography B, 1999, 736, 273-287.

[6] M. A. Strausbauch, J. P. Landers, P. J. Wettstein, *"mechanism of peptide separations by solid phase extraction capillary electrophoresis at low pH"*. Analytical Chemistry, 1996, 68, 306-314.

[7] A. J. Tomlinson, W. D. Braddock, L. M. Benson, R. P. Oda, S. Naylor, *"Preliminary investigations of preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry"*. Journal of Chromatography B, 1995, 669, 67-73.

[8] G. Zhang, H. Fan, C. Xu, H. Bao, P. Yang, *"On-line preconcentration of in-gel digest by ion-exchange chromatography for protein identification using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry"*. Analytical Biochemistry, 2003, 313, 327-330.

[9] Q. Luo, J. D. Andrade, *"Phytic acid as an efficient low-molecular-mass displacer for anion-exchange displacement chromatography of proteins"*. Journal of Chromatography B, 2000, 741, 23-29.

[10] F. Nau, A. Mallard, J. Pages, G. Brulé, *"Reversed-phase liquid chromatography of egg white proteins. optimization of ovalbumin elution"*. Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques, 1999, 22, 1129-1147.

[11] B. S. Welinder, H. H. Sorensen, *"Alternative mobile phases for the reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins"*. Journal of Chromatography, 1991, 537, 181-199.

[12] L. Longerich, S. Vasdev, E. Johnson, M. H. Gault, *"Disposable-column radioimmunoassay for serum digoxin with less interference from metabolites and endogenous digitalis-like factors"*. Clinical Chemistry, 1988, 34, 2211-2216.

[13] A. Namera, M. Yashiki, Y. Iwasaki, M. Ohtani, T. Kojima, *"Automated procedure for determination of barbiturates in serum using the combined system of PreStation and gas chromatography-mass spectrometry"*. Journal of Chromatography B, 1998, 716, 171-176.

[14] N. J. Cartel, *"Purification of human brain metallothionein by organic ad reversed-phase high-performance liquid chromatography under acidic conditions"*. Journal of Chromatography B, 1996, 676, 159-164.

[15] G. Álvarez Llamas, M. R, Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, *"Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 460-466.

[16] J. H. Beattie, *"Strategies for the qualitative and quantitative analysis of matallothionein isoforms by capillary electrophoresis"*. Talanta, 1998, 46, 255-270.

[17] C. B. Knudsen, J. H. Beattie, *"On-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis for enhanced detection sensitivity and selectivity: application to the analysis of metallothioneins isoforms in sheep fetal liver"*. Journal of Chromatography A, 1997, 792, 463-473.

[18] A. K. Kabziński, *"Application of solid-phase extraction to the preconcentration of metallothionein and metals from physiological fluids"*. Journal of Chromatography A, 1997, 766, 121-131.

[19] A. K. M. Kabziński, *"The determination of environmental and industrial exposure to heavy metals based on the quatitative isolation of metallothionein from human fluids, with application of covalent affinity chromatography with tiol-disulphide interchange gel as a solid-phase extraction support"*. Talanta, 1998, 46, 335-346.

[20] A. K. Kabziński, *"Quantitaive determination of Cu-thionein from human fluids with application of solid-phase extraction on covalent affinity chromatography with thiol-disulphide interchange support"*. Biomedical Chromatography, 2000, 14, 160-165.

[21] J. Muñoz, J. R. Baena, M. Gallego, M. Varcárcel, *"Development of a method for the determination of inorganic cadmiun metallothioneins in fish liver by continuous preconcentration on fullerene and flame atomic absorption spectrometry"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17, 716-720.

[22] K. Polec, O. G. Arribas, M. P. Calvo, J. Szpunar, B. R. Ozonas, R. Lobinski, *"Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 1363-1368.

[23] L. Wang, S. W. May, R. F. Browner, *"Low-flow interface for liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry speciation using an oscillating capillary nebulizer"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1996, 11, 1137-1146.

[24] M. A. Tarr, G. Zhu, R. F. Browner, *"Microflow ultrasonic nebulizer for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry"*. Analytical Chemistry, 65, 1993, 1689-1695.

[25] S. A. Pergantis, E. M. Heithmar, T. A. Hinners, *"Microscale flow injection and microbore high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry via a high-efficiency nebulizer"*. Analytical Chemistry, 1995, 67, 4530-4535.

[26] J Otero Romaní, A. Moreda Piñeiro, A. Bermejo Barrera, P. Bermejo Barrera, "*Evaluation of comercial C18 cartridges for trace elements solid phase extraction from seawater followed by inductively coupled plasma – optical emisión spectrometry determination*". Analytica Chimica Acta, 2005, 536, 213-218.

[27] *"Statgraphics plus 5.0"*. 1989 Ed. Manugestic. Rockville MD, Estados Unidos

[28] 2003, Millipore Corporation. Billerica, MA, Estados Unidos.

CAPÍTULO VI

APLICACIONES A MUESTRAS DE MEJILLÓN DE BATEA DE LA RÍA DE AROUSA

INDICE

I-OBJETIVO 401
II- PARTE EXPERIMENTAL 405
2.1-Reactivos 407
2.2- Material 409
2.3- Limpieza del material 411
2.4- Área de estudio 413
2.5- Muestras de mejillón de batea. Muestreo y preparación 414
2.6- Estudio quimiométrico de los niveles totales de metal 415
2.6.1- Pretratamiento de los datos 420
2.6.2- Análisis de componentes principales 420
2.6.3-Análisis de cluster 434
2.7- Estudio quimiométrico de los niveles totales de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociado a sustancias de bajo peso molecular 438
2.7.1- Análisis de componentes principales 449
2.7.1.1- Niveles totales de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn (*concentración en peso seco*) 449
2.7.1.2- Niveles de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligado a sustancias de bajo peso molecular 453
2.7.1.3- Porcentajes de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligado a las sustancias de bajo peso molecular 457
2.7.2- Análisis de cluster 461
2.7.2.1- Niveles totales de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn (*concentración en peso seco*) 462
2.7.2.2- Niveles de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligado a sustancias de bajo peso molecular 463
2.7.2.3- Porcentajes de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn ligado a las sustancias de bajo peso molecular 465
2.8- Estudio quimiométrico de la fracción de metales ligados a la isoforma **MLP-I** 466
2.8.1- Análisis de componentes principales 466
2.8.2- Análisis de cluster 469
IV- CONCLUSIONES 471
V- BIBLIOGRAFÍA 475

OBJETIVO

OBJETIVO

La Ría de Arousa es conocida por su gran producción mejillonera. Consta de un gran número de bateas, así como de una gran superficie donde albergarlas. Esto hace que una de las fuentes de ingresos más importante de la población de ésta zona sea el cultivo del mejillón. Por otro lado, la presencia de industrias en los márgenes de la ría, tales como fábricas de curtidos, las cuales utilizan derivados cromados en los tintes, o de aluminio, inducen la existencia de vertidos metálicos que pueden ser altamente contaminantes para la flora y fauna de la zona.

Generalmente los metales vertidos se asocian a los sedimentos, pasando más tarde a las plantas o animales, como el mejillón que lo incorpora a través de procesos de filtración. Esto hace que los mejillones sean unos buenos bioindicadores de la contaminación metálica. Por otro lado, el incremento de las proteínas similares a las metaloproteínas también está asociado a este tipo de contaminación, lo que provoca que su estudio sea de gran interés.

En este último capítulo se recogen las aplicaciones de algunos de los métodos optimizados. Las muestras analizadas son muestras de mejillón de batea recogidas en 16 puntos de muestreo diferentes a lo largo de cuatro campañas de muestreo, invierno y verano de 2002, e invierno y verano de 2003. Asimismo, se realizan estudios comparativos de los resultados con la ayuda de herramientas quimiométricos de reconocimiento de pautas no supervisado tales como el análisis de componentes principales y el análisis de cluster.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1- REACTIVOS

* Disolución patrón de nitrato de cromo (III) de 1000±0,002 µg/ml de Merck (Darnstadt, Alemania).
* Disolución patrón nitrato de plomo (II) de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cadmio de 1000±0,002 µg/ml(Merck).
* Disolución patrón de nitrato de cobre (II) de 1000 µg/ml de Perkin Elmer (Norwalk, Estados Unidos).
* Disolución patrón de nitrato de cinc de 1000 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de cloruro de arsénico (III) de 1000 µg/ml de Fluka (Steinheim, Suiza).
* Disolución patrón de nitrato de níquel de 1000±0,002 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de vanadio de 997±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de estaño (II) de 1000±5 µg/ml de BDH (Poole, Reino Unido).
* Disolución patrón de cloruro de cobalto de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de silicio de 1005±5 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de dióxido de selenio de 1001±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de bario de 1000 µg/ml (BDH).
* Disolución patrón de nitrato de estroncio de 999±2 µg/ml (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de aluminio de 1000 µg/ml, (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de hierro (III) de 1000 µg/ml (Pekin Elmer).
* Tris-(hidroxietil)-aminometano de Riedel-de Haën (Steinheim, Suiza).
* 2-Mercaptoetanol 99% (Fluka).
* Fenilmetilsulfonil fluoruro 99% (Fluka).
* Cloruro sódico (Merck).
* Ácido clorhídrico 37% de J. T Baker (Deventer, Holanda).
* Ácido nítrico 65% (Panreac).
* Ácido nítrico 69%, (J. T. Baker).
* Disolución patrón de nitrato de magnesio de 10000 mg/l preparado a partir de nitrato de magnesio (Merck).
* Disolución patrón de nitrato de paladio de 1000 mg/l (Perkin Elmer).
* Triton X-100 (Merck).
* Peróxido de hidrógeno 33% (p/v) (Panreac).
* Argón, Airliquide N-50 de Jaime Rey (A Coruña, España).
* Acetileno Airliquide N-26 (Jaime Rey).

* Nitrógeno Airliquide B-50 (Jaime Rey).

* Agua ultrapura Milli-Q de 18,2 MΩcm de resistividad específica obtenida con un sistema purificador Milli-Q de Millipore Corp. (Massachusetts, Estados Unidos).

2.2- MATERIAL

* Espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo 1100B de Perkin-Elmer, con corrector de fondo de lámpara de deuterio. Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos.
* Cámara de Grafito HGA-400 (Perkin Elmer).
* Muestreador automático AS-40 (Perkin Elmer).
* Tubos de grafito pirolítico con plataforma L´Vov (Perkin Elmer).
* Espectrofotómetro de absorción / emisión atómica de llama modelo 3110 (Perkin Elmer).
* Especrofotómetro de Emisión Atómica con Plasma Acoplado por Inducción modelo Optima 3300 DV (Perkin Elmer).
* Muestreador AS 91 (Perkin Elmer).
* Bomba Peristáltica (Perkin Elmer).
* Bomba de HPLC 515 de Waters (Milford, MA, Estados Unidos).
* Detector de UV-VIS 486 (Waters).
* Software Millennium (Waters).
* Inyector, válvula de inyección Rheodyne 7725i de Rheodyne (Cotati, CA, Estados Unidos).
* Jeringa Hamilton de 100 µl modelo 81030 de Hamilton (Reno, Nevada, Estados Unidos).
* Columna de vidrio de intercambio iónico DEAE-5PW, 8X75 mm (Waters).
* Lámpara de cátodo hueco de Cr de Cathodeon (Cambridge, Reino Unido).
* Lámpara de cátodo hueco de Cd (Perkin Elmer).
* Lámpara de cátodo hueco de Cu (Cathodeon).
* Lámpara de cátodo hueco de Zn (Perkin Elmer).
* Lámpara de descarga de electrodos de Pb (Perkin Elmer).
* Fuente para lámparas de descarga modelo System 1 (Perkin Elmer).
* Sistema de homogenización Stomacher Lab Blender 400 de Seward Med. Ltd. (Londres, Reino Unido).
* Bolsas para Stomacher 6041/CLR (Seward).
* Agitador Vibromatic, Selecta, Barcelona, España.
* Centrífuga Centromix, modelo 540 (Selecta).
* Ultracentrífuga Laborzentrifugen, modelo 2K15 de Sigma (Osterode, Alemania).
* Peachímetro Thermo Orion, modelo 720 de Orion Research (Cambridge, Reino Unido).
* Electrodo Thermo Orion 8102BN (Orion).
* Microondas doméstico Taurus, programable en tiempo y potencia (150-800 W) de Taurus (Barcelona, España).

* Bombas de baja presión de politetrafluoroetileno (PTFE), fabricadas en laboratorio.

* Liofilizador LYPH-LOCK6, modelo 77530 de Laboconco Corporation (Kansas City, Estados Unidos).

* Molino de bolas de tipo vibratorio, con cilindros de Zr de 15 ml de volumen y bolas de Zr de 7 mm de diámetro de Retsch (Haan, Alemania).

* Balanza Sartorios BL 610, (Selecta).

* Balanza Sartorius BP 121 S, (Selecta).

* Paquetes estadísticos STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Hamburgo, Alemania), UNSCRAMBLER 1998 (CAMO ASA, Trondheim, Noruega) y STATGRAPHICS Plus V. 5.0, 1994-1999 (Manugistics Inc., Rockville M. D. Estados Unidos).

* Micropipetas Wilson, Kartell y Socorex de volumen fijo y variable con puntas desmontables y desechables.

* Material de vidrio tipo Pyrex, polietileno y teflón para la preparación y almacenamiento de disoluciones y muestras.

2.3- LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material se lava primero con agua potable y jabón. A continuación, se enjuaga con agua Milli-Q y por último se introduce en un baño que contiene ácido nítrico al 10% en el que permanece 48 horas. Transcurrido este tiempo, el material se vuelve a lavar como mínimo tres veces con agua Milli-Q y por último se seca en estufa. Una vez seco se protege de la exposición ambiental con parafilm y se almacena.

Con respecto a la limpieza de las bombas de teflón, éstas se pueden limpiar de la forma descrita anteriormente o sometiéndolas a radiación de microondas, siendo ésta una forma más rápida. Para ello, primero se lavan con agua y jabón, y a continuación con agua Milli-Q. Se le añade a cada una 2 ml de HNO_3 al 65% y se someten a radiación de microondas hasta que el nítrico quede totalmente transparente. El nítrico se cambia cada vez que se aplica la radiación. Por último se enjuagan con agua Milli-Q y se secan en estufa.

2.4- ÁREA DE ESTUDIO

La Ría de Arousa es el mayor estuario, tanto en extensión (200 km^2) como en producción mejillonera (entorno al 70 % de la producción española de mejillón), de las dieciocho rías gallegas. La Ría de Arousa pertenece a las denominadas *Rías Baixas* y delimita las provincias de A Coruña y Pontevedra, siendo el margen derecho de la misma la parte perteneciente a la provincia de A Coruña y el izquierdo el perteneciente a la provincia de Pontevedra (**figura 6.1**).

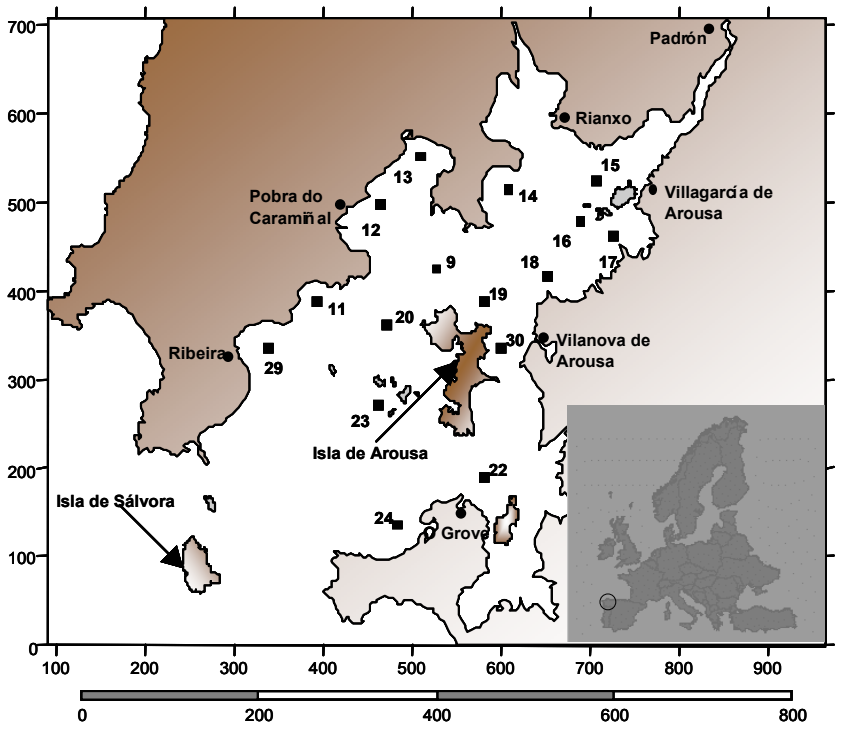


Figura 6.1: Situación geográfica de la Ría de Arousa

El sistema de drenaje del estuario está formado por varios ríos de los que destacan por tamaño los ríos Ulla y Umia. El río Ulla es la corriente fluvial más importante con un área de drenaje estimada en 2804 km^2 y un caudal absoluto de 79.3 $m^3\ s^{-1}$. Por su parte, el río Umia tiene un área de drenaje menor, 440 km^2, y un caudal absoluto de 16.3 $m^3\ s^{-1}$ **[1]**. Teniendo en cuenta las características barométricas y los procesos oceanográficos en la Ría de Arousa, se pueden distinguir tres zonas diferenciadas en este estuario. Una zona interna, que se corresponde con la parte más estrecha de la ría (**figura 6.1**) en la cual predomina un ambiente netamente de estuario

debido a la continua mezcla del agua dulce de río Ulla y el agua marina del océano Atlántico. Se considera la segunda zona como aquella situada en el centro de la ría, la cual se corresponde con el eje central de la misma y que se encuentra protegida por la presencia de la Illa de Arousa. La última zona a resaltar es la parte más externa de la ría, en contacto directo con el mar abierto. Cerca de la desembocadura del río Ulla se encuentra la población de Vilagarcía de Arousa, uno de los núcleos urbanos más importantes de la zona. Sobre el río Ulla se vierten así residuos de origen tanto urbano como industrial, especialmente existen vertidos de cromo debido a industrias de curtido de pieles en la población de Padrón (**figura 6.1**). Así, se han encontrado altas concentraciones de cromo en muestras de sedimentos de la parte interna de la Ría de Arousa y en los sedimentos fluviales del río Ulla **[2, 3]**.

Se ha establecido que la circulación de agua en la Ría de Arousa tiene lugar a través de dos corrientes, la primera consiste en una corriente profunda que entra desde el océano Atlántico por el margen izquierdo de la ría, cara sur (**figura 6.1**), describiendo un movimiento antihorario (hacia la derecha, cara norte), arrastrando las aguas del río Ulla hacia el margen derecho de la ría. La segunda corriente, corriente de salida, es una corriente superficial, por lo que en la parte interna de la ría existe un movimiento vertical de las aguas importante. Por otra parte, el caudal correspondiente a la corriente entrante es muy superior al caudal de la corriente de salida, estableciéndose un estancamiento parcial de las aguas en la zona derecha del estuario **[1]**.

2.5- MUESTRAS DE MEJILLÓN DE BATEA. MUESTREO Y PREPARACIÓN

Las muestras de mejillón de batea empleadas en el presente estudio se corresponden a la variedad *Mytilus galloprovincialis*, una de las más extendidas en la costa atlántica. Las muestras se recogieron en distintos polígonos mejilloneros de la Ría de Arousa (**figura 6.1**) en campañas llevadas a cabo por miembros del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. Se realizaron cuatro campañas de muestreo distintas; la primera en febrero de 2002, la segunda en julio de 2002, la tercera en febrero de 2003 y la cuarta en julio de 2003. Los puntos de recogida se distribuyeron a lo largo de toda la ría. Así, los puntos codificados como 15, 16 y 17 se corresponden a muestras cercanas a la desembocadura del río Ulla (cerca de la población de Vilagarcía de Arousa). Por otra parte, los puntos de recogida 18, 19 y 30 se encuentran cercanos a otra importante población (Vilanova de Arousa) y el punto 22 está cercano a las poblaciones de O Grove y Cambados. Todos estos puntos de recogida se sitúan en el margen izquierdo (cara sur de

la ría) del estuario. De manera similar, los puntos de muestreo 11, 12, 13 y 29 se encuentran cerca de las poblaciones de Pobra do Caramiñal y Ribeira, ambas localizadas en la parte derecha (cara norte de la ría) de la ría. Finalmente, los puntos 9, 14, 20, 23 y 24 caen en el eje central de la ría.

Después de la recolección de las muestras, los mejillones se mantuvieron a baja temperatura y se transportaron al laboratorio. Primeramente, se eliminó el biso y la concha y se creó una muestra compuesta por el tejido blando de los mejillones a partir de, aproximadamente, 50 especimenes (tamaño de la concha entre 3 y 7 cm). Cada muestra compuesta se dividió en dos partes, homogenizando una de ellas por percusión y reservando la otra que se conservó a -40 °C. La porción de muestra homogenizada se dividió a su vez en dos partes; la primera se utilizó para la determinación del contenido de metales en peso húmedo y la segunda se sometió a un proceso de liofilización a -40 °C durante dos semanas. Esta última porción se empleo en la determinación del contenido de metales en peso seco. Las porciones de mejillón húmedo sin homogenizar se sometieron a los distintos procesos de preparación del extracto citósolico, bien para determinar los niveles de metales asociados a sustancias de bajo peso molecular (SBPM) o para determinar los metales asociados a la isoforma I de las proteínas similares a las metalotioneínas (MLP-I).

2.6- ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE LOS NIVELES TOTALES DE METAL

Las muestras de mejillón de batea correspondientes a los cuatro muestreos se sometieron al procedimiento de digestión ácida asistida en horno microondas descrito en el Capítulo I. Cada muestra se prepara por triplicado, determinándose la concentración de metales en los digeridos ácidos por ICP-OES. Las condiciones instrumentales de medida son las recogidas en la **tabla 1.16** del Capítulo I.

Los valores de concentración de metales encontrados para cada muestra en cada uno de los cuatro muestreos se listan en las **tablas 6.1** a **6.4**. Los resultados están expresados en forma de una media de las concentraciones de los tres digeridos ± la desviación estándar de esas tres concentraciones.

Tabla 6.1: Concentraciones de metales en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	[Al]/(µg/g)	[As]/(µg/g)	[Ba]/(µg/g)	[Cd]/(µg/g)	[Cr]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Fe]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Ni]/(µg/g)	[Pb]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	52,43±7,92	9,73±1,10	0,37±0,05	0,34±0,01	1,28±0,68	6,86±0,11	99,05±4,77	7,85±0,12	1,48±0,62	0,77±0,05	58,98±0,88
11	35,04±3,17	10,89±0,82	0,56±0,04	0,50±0,04	0,73±0,05	6,20±0,41	89,97±8,30	9,54±0,31	0,95±0,10	0,58±0,03	98,76±0,26
12	64,76±3,26	8,90±0,70	0,39±0,02	0,32±0,00	0,68±0,05	7,86±0,19	117,48±3,32	6,24±0,15	< LOD	0,84±0,01	54,59±0,63
13	101,04±13,41	9,99±2,39	0,46±0,08	0,32±0,03	0,63±0,01	6,10±0,05	150,70±1,05	6,33±0,18	< LOD	1,93±0,01	79,52±1,51
14	119,46±4,64	7,34±1,17	0,57±0,13	0,32±0,02	1,66±0,53	9,19±3,48	174,49±8,15	10,75±0,80	1,52±0,04	1,11±0,70	66,57±7,75
15	123,61±2,11	8,14±0,17	0,54±0,01	0,29±0,01	1,06±0,01	6,52±0,07	192,83±3,88	9,42±0,32	0,57±0,22	1,76±0,02	63,63±1,94
16	206,08±3,42	7,75±1,22	0,59±0,02	0,32±0,04	1,67±0,26	8,64±0,73	253,71±36,63	9,82±1,34	1,81±0,08	1,33±0,03	74,78±8,94
17	85,64±2,61	8,93±0,84	0,45±0,04	0,71±0,01	0,88±0,05	6,40±0,04	114,12±19,01	9,53±0,68	1,94±0,00	0,89±0,12	95,33±2,29
18	111,05±10,83	8,34±1,33	0,68±0,08	0,34±0,00	0,95±0,08	7,37±0,15	168,31±8,97	9,69±0,00	0,49±0,09	1,12±0,02	80,16±0,07
19	67,17±8,28	10,71±0,13	0,32±0,01	0,56±0,32	0,69±0,05	7,19±0,38	122,88±18,83	8,03±0,08	1,35±0,11	0,91±0,21	58,98±0,88
20	74,83±27,87	9,26±0,24	0,36±0,10	0,40±0,04	0,68±0,14	7,44±2,00	130,35±19,02	6,43±0,35	< LOD	1,25±0,42	109,74±1,87
22	426,65±70,63	10,27±0,96	0,78±0,15	0,45±0,03	0,94±0,09	7,64±0,59	246,12±37,25	6,07±0,29	< LOD	1,59±0,11	113,25±3,75
23	32,51±5,70	10,60±0,40	0,22±0,02	0,87±0,01	0,65±0,22	5,58±0,03	88,33±9,19	6,22±0,20	< LOD	0,77±0,01	87,38±1,42
24	113,23±3,23	10,66±0,97	0,63±0,00	0,84±0,02	0,79±0,03	8,54±0,72	141,69±4,93	6,57±0,03	1,27±0,54	1,32±0,16	152,64±9,24
29	46,18±6,93	8,20±1,74	0,46±0,03	0,74±0,02	0,57±0,03	4,70±0,01	101,94±9,46	5,33±0,29	< LOD	0,95±0,03	49,86±2,14
30	52,02±10,99	8,23±0,76	0,31±0,10	0,63±0,28	0,51±0,02	4,99±0,39	107,36±30,84	5,32±0,09	< LOD	1,03±0,06	73,46±4,64

Tabla 6.2: Concentraciones de metales en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	[Al]/(µg/g)	[Ba]/(µg/g)	[Cd]/(µg/g)	[Co]/(µg/g)	[Cr]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Fe]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Ni]/(µg/g)	[Pb]/(µg/g)	[V]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	34,85±12,80	< LOD	1,10±0,09	0,22±0,04	0,,87±0,04	5,08±0,21	147,70±3,50	5,99±0,07	1,15±0,12	1,00±0,05	21,92±0,61	90,11±2,08
11	< LOD	< LOD	0,89±0,08	0,30±0,07	0,57±0,06	4,01±0,39	-	5,19±0,72	1,01±0,12	0,78±0,07	11,94±1,13	80,66±0,49
12	12,91±0,36	0,38±0,08	1,60±0,13	< LOD	0,68±0,02	1,58±0,02	81,14±14,69	5,39±0,10	0,97±0,17	0,31±0,01	33,85±1,93	27,81±2,45
13	< LOD	< LOD	0,97±0,06	0,18±0,02	0,63±0,08	4,75±0,31	35,45±3,38	5,94±0,07	0,92±0,05	1,00±0,07	16,25±0,04	100,56±0,36
14	< LOD	< LOD	0,67±0,06	< LOD	0,62±0,02	4,96±0,22	-	5,56±0,09	1,18±0,13	1,03±0,04	12,31±0,29	50,76±2,18
15	97,40±4,33	0,45±0,00	0,81±0,05	0,45±0,06	1,00±0,08	5,11±0,14	164,86±2,31	6,66±0,13	1,32±0,17	1,01±0,02	17,52±0,18	61,44±2,24
16	-	< LOD	0,74±0,07	0,24±0,06	1,00±0,02	5,68±0,11	69,24±3,85	9,08±0,61	0,74±0,04	1,11±0,00	15,43±0,19	61,72±11,05
17	23,48±0,52	0,15±0,03	0,97±0,05	< LOD	0,64±0,05	4,21±0,34	50,99±7,02	5,56±0,52	0,61±0,05	0,79±0,01	17,67±0,04	55,99±7,99
18	-	-	1,02±0,04	0,34±0,03	0,60±0,06	4,03±0,14	74,59±3,92	6,01±0,19	0,66±0,04	0,79±0,03	19,98±1,89	86,55±0,82
19	34,35±1,21	0,29±0,02	1,11±0,09	0,27±0,09	0,87±0,14	5,21±0,44	91,59±6,06	7,02±0,32	0,80±0,02	1,04±0,12	18,08±0,00	94,69±3,99
20	15,83±0,91	0,26±0,01	1,28±0,03	0,29±0,02	0,49±0,02	5,58±0,09	71,76±1,42	5,54±0,08	0,88±0,12	1,13±0,02	21,47±0,28	104,85±5,76
22	127,14±0,48	0,56±0,04	1,06±0,05	< LOD	0,98±0,07	2,37±0,27	184,88±2,14	5,45±0,03	0,57±0,11	0,47±0,06	6,96±0,10	27,79±1,77
23	28,55±7,00	0,56±0,05	1,72±0,05	< LOD	0,78±0,05	4,17±0,11	84,39±5,01	3,28±0,12	< LOD	0,84±0,03	8,97±0,17	85,69±3,07
24	40,76±0,67	0,42±0,01	1,50±0,09	0,26±0,06	0,84±0,06	5,33±0,18	113,30±3,87	4,36±0,03	< LOD	1,06±0,02	9,94±0,19	157,17±2,83
29	14,62±1,14	0,26±0,07	1,33±0,07	< LOD	0,46±0,08	6,94±0,52	65,08±2,45	4,09±0,03	0,97±0,07	1,37±0,11	35.63±0,17	63,50±4,03
30	14,55±1,67	0,28±0,01	1,19±0,06	0,32±0,06	0,82±0,04	4,59±0,25	74,92±5,39	6,65±0,10	0,56±0,04	0,91±0,05	14,72±0,73	124,70±5,51

Tabla 6.3: Concentraciones de metales en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2003)

Muestra Nº	[Al]/(µg/g)	[As]/(µg/g)	[Ba]/(µg/g)	[Cd]/(µg/g)	[Co]/(µg/g)	[Cr]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Fe]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Ni]/(µg/g)	[Pb]/(µg/g)	[V]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	47,58±3,79	7,94±0,86	0,36±0,01	0,98±0,08	0,48±0,04	0,97±0,01	6,37±0,36	119,76±0,22	14,38±0,66	0,68±0,05	1,31±0,08	2,43±0,09	107,45±5,29
11	52,79±1,03	7,33±0,94	0,38±0,02	0,86±0,09	0,49±0,01	1,13±0,03	6,99±0,65	129,80±0,41	11,02±0,29	0,72±0,03	1,41±0,13	2,09±0,09	117,38±6,77
13	113,30±20,02	6,41±1,04	0,42±0,04	1,05±0,07	0,46±0,05	0,97±0,06	6,14±0,69	160,99±8,67	11,31±0,40	1,68±0,38	1,26±0,14	3,30±0,10	11,76±5,75
14	142,75±12,25	2,72±0,40	0,47±0,06	0,56±0,02	0,60±0,03	1,44±0,07	6,59±0,50	224,37±4,88	17,46±0,82	1,31±0,22	1,33±0,10	2,62±0,27	87,68±6,65
15	198,65±8,11	6,52±0,48	0,58±0,07	0,84±0,04	1,52±0,06	1,85±0,04	7,89±1,02	353,06±14,64	45,31±1,40	2,26±0,14	1,73±0,28	2,24±0,24	134,53±18,33
16	158,96±1,66	9,54±0,35	0,63±0,07	0,82±0,06	0,84±0,07	1,57±0,05	7,42±0,55	248,34±6,74	34,36±1,65	1,57±0,04	1,51±0,13	2,11±0,20	119,39±11,96
17	108,93±25,44	6,98±1,30	0,60±0,19	0,64±0,01	1,09±0,01	1,52±0,04	8,24±0,53	265,35±11,97	26,16±3,46	1,87±0,14	1,65±0,10	2,00±0,24	113,38±5,93
18	192,17±1,69	8.06±0,79	0,66±0,04	1,14±0,07	0,81±0,05	1,62±0,12	7,97±1,10	249,33±7,73	23,77±0,72	2,02±0,14	2,04±0,37	3,85±0,12	167,95±15,29
19	63,23±2,95	3,75±0,62	0,30±0,03	0,81±0,04	0,32±0,06	1,15±0,11	11,57±0,34	119,65±0,40	10,82±0,21	1,43±0,14	2,34±0,06	1,67±0,08	170,71±6,10
20	68,42±20,10	13,57±1,77	0,34±0,01	1,34±0,14	0,25±0,04	0,90±0,06	5,85±0,34	100,03±1,30	8,01±0,11	< LOD	1,22±0,08	1,60±0,02	126,50±2,57
22	154,43±22,01	14,63±0,22	0,64±0,09	1,24±0,05	0,32±0,04	1,11±0,03	6,70±0,48	202,83±6,96	13,51±0,53	1,47±0,30	1,36±0,09	1,55±0,06	156,62±11,28
23	45,16±6,22	12,26±0,74	0,48±0,06	1,32±0,08	0,28±0,02	0,99±0,06	5,00±0,08	98,79±7,42	7,79±0,15	0,80±0,10	1,03±0,03	1,28±0,06	130,13±7,29
24	71,54±1,90	17,50±0,66	0,55±0,01	1,85±0,14	0,33±0,04	1,12±0,11	5,67±0,41	147,77±1,12	7,56±0,29	0,80±0,07	1,24±0,01	1,86±0,23	239,22±40,73
29	40,72±6,53	4,83±1,02	0,34±0,02	1,07±0,05	0,25±0,03	0,96±0,09	5,88±0,14	84,77±5,60	6,13±0,21	1,13±0,04	1,23±0,07	2,16±0,16	95,76±5,05
30	34,57±2,56	7,42±0,08	0,35±0,01	1,32±0,12	0,33±0,01	0,71±0,06	5,79±0,24	85,54±3,41	8,97±0,52	1,44±0,03	1,19±0,05	1,76±0,02	180,91±9,91

Tabla 6.4: Concentraciones de metales en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2003)

Muestra Nº	[Al]/(µg/g)	[Ba]/(µg/g)	[Cd]/(µg/g)	[Co]/(µg/g)	[Cr]/(µg/g)	[Cu]/(µg/g)	[Fe]/(µg/g)	[Mn]/(µg/g)	[Ni]/(µg/g)	[Pb]/(µg/g)	[V]/(µg/g)	[Zn]/(µg/g)
9	43,57±5,53	1,04±0,05	0,81±0,09	0,39±0,02	0,052±0,03	4,35±0,36	83,66±4,77	8,85±0,56	0,50±0,09	0,87±0,08	1,63±0,18	120,59±7,88
11	110,48±7,48	2,34±0,03	0,76±0,06	0,38±0,05	0,74±0,01	5,14±0,29	162,61±7,17	18,29±0,24	0,78±0,10	1,04±0,02	1,76±0,02	103,54±2,95
13	154,79±10,6	2,12±0,06	1,11±0,11	0,37±0,05	0,93±0,01	5,46±0,89	226,18±5,95	6,88±0,12	0,42±0,11	1,09±0,19	2,31±0,07	144,64±3,61
14	68,86±1,62	0,71±0,01	0,56±0,02	0,28±0,08	0,79±0,02	4,49±0,12	115,22±4,32	12,55±0,14	0,41±0,06	0,90±0,04	1,05±0,07	95,08±1,91
15	90,57±6,00	1,33±0,05	0,43±0,04	0,25±0,04	0,79±0,06	4,18±0,21	124,53±8,56	14,52±0,64	1,02±0,07	0,84±0,07	1,21±0,04	55,71±2,58
16	188,64±4,39	1,33±0,02	0,40±0,09	0,36±0,04	1,25±0,13	5,46±0,27	244,08±9,59	14,75±0,60	0,72±0,04	1,12±0,05	1,47±0,03	74,94±2,15
17	39,96±0,81	0,95±0,02	0,57±0,02	< LOD	0,50±0,02	3,58±0,06	81,50±1,55	11,82±0,20	0,69±0,06	0,75±0,05	1,00±0,07	80,13±0,94
18	63,67±5,90	1,58±0,03	0,83±0,08	0,26±0,05	0,67±0,05	4,69±0,02	118,36±3,48	6,97±0,21	0,68±0,09	0,92±0,01	2,37±0,02	98,18±7,47
19	79,17±3,26	2,43±0,23	1,02±0,18	0,25±0,05	0,73±0,08	5,40±0,18	151,22±4,32	4,74±0,04	0,55±0,01	1,05±0,02	2,33±0,04	149,91±2,43
20	25,23±0,50	1,76±0,09	1,28±0,03	0,29±0,08	0,91±0,02	3,57±0,38	89,39±3,30	3,84±0,10	0,82±0,00	0,81±0,17	2,33±0,02	154,12±2,27
22	104,10±6,20	1,08±0,02	1,09±0,12	0,43±0,16	1,08±0,05	5,08±0,60	180,74±4,10	9,04±0,23	0,81±0,01	1,01±0,11	2,06±0,04	177,80±3,03
23	46,08±7,65	2,36±0,15	1,17±0,04	< LOD	0,63±0,10	4,99±0,40	92,10±1,91	3,93±0,11	0,91±0,07	0,98±0,06	2,56±0,16	120,56±4,41
29	52,18±4,74	2,82±0,02	1,19±0,03	< LOD	0,57±0,05	5,36±0,12	108,18±2,61	5,59±0,07	0,48±0,04	1,12±0,03	2,77±0,06	112,80±2,47
30	33,43±3,30	1,39±0,02	0,84±0,12	0,22±0,04	0,46±0,07	5,54±0,90	87,74±1,65	5,11±0,06	0,40±0,04	1,32±0,11	1,53±0,03	127,14±1,58

2.6.1- PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS

Previo a cualquier aplicación quimiométrica, se hace necesaria la homogenización o normalización de los datos que conforman la matriz de trabajo. Esto es así, ya que dada la gran diferencia entre los niveles de los metales estudiados, si éstos se utilizasen en bruto, los resultados estadísticos estarían sesgados siendo aquellos metales presentes en mayor concentración los que ofrecerían un mayor peso en el modelo matemático creado para hacer la clasificación. De esta forma, todos los resultados de concentración se normalizaron usando como pretratamiento de los datos la transformación *half-range and central value* **[4]**, que convierte los valores mínimos en 1, los máximos en -1 y los centrales en 0.

La **ecuación 6.1** expresa la transformación matemática llevada a cabo para hacer la normalización. En ella es necesario calcular los parámetros valor central (*central va*lue, cv_j) y rango medio (*half range*, hr_j) calculados a través de las **ecuaciones 6.2** y **6.3**, respectivamente.

$$Xij = \frac{Xij - CVi}{hri} \quad \textbf{(Ec. 6.1)}$$

$$cvj = \frac{Max(xj) + Min(xj)}{2} \quad \textbf{(Ec. 6.2)}$$

$$hrj = \frac{Max(xj) - Min(xj)}{2} \quad \textbf{(Ec. 6.3)}$$

donde Max(xj) es el valor máximo y Min(xj) es el valor mínimo de cada columna de la matriz de datos (cada metal).

2.6.2- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Una vez normalizados los datos, se aplicó análisis de componentes principales (PCA) utilizando la validación cruzada como método de validación **[5]**. Este procedimiento es adecuado para determinar el número de componentes principales necesarios para explicar el conjunto de datos. Lo que hace es dividir los datos en k grupos de forma aleatoria, calculando cada componente k veces y eliminando los datos de uno de los grupos en cada ocasión. Se construye así una función estadística que nos ayuda a decidir el número de componentes principales que son necesarios. Los resultados obtenidos en cada caso se analizan posteriormente.

Al aplicar PCA a los resultados obtenidos en el primer muestreo se obtienen los porcentajes de variabilidad acumulativa y explicada por los distintos PC que se muestran en la **tabla 6.5.**

Tabla 6.5: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el primer muestreo (febrero de 2002)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	4,55	41,36	41,36
2	2,38	62,97	21,61
3	1,67	78,12	15,15
4	0,65	83,99	5,87
5	0,47	88,29	4,29
6	0,46	92,51	4,22
7	0,42	96,32	3,81
8	0,15	97,68	1,37
9	0,12	98,77	1,09
10	0,10	99,72	0,95
11	0,03	100,00	0,28

Como se puede observar, los tres primeros PC muestran valores de eigenvalue mayores que la unidad, explicando entre los tres un 78% de variabilidad.

Los pesos (*loadings*) de cada variable en los tres primeros PC se recogen en la **tabla 6.6**. Las variables que presentan mayores pesos en el PC 1 son Fe (0,417), Cr (0,388), Cu (0,361), Ba (0,353), Al (0,321) y Cd (-0,317). El PC 2 viene explicado fundamentalmente por Zn (0,393), Mn (-0,385), Al (0,381), Pb (0,377) y Ni (-0,375). Por último, los *loadings* de mayor peso sobre el PC 3 son Zn (0,535), As (0,451) y Ni (0,436).

Tabla 6.6: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	0,321	0,381	-0,006
As	-0,190	0,269	0,451
Ba	0,353	0,241	0,114
Cd	-0,317	0,115	0,326
Cr	0,388	-0,284	0,051
Cu	0,361	-0,042	0,253
Fe	0,417	0,209	-0,132
Mn	0,291	-0,385	0,176
Ni	0,200	-0,375	0,436
Pb	0,233	0,377	-0,292
Zn	0,045	0,393	0,535

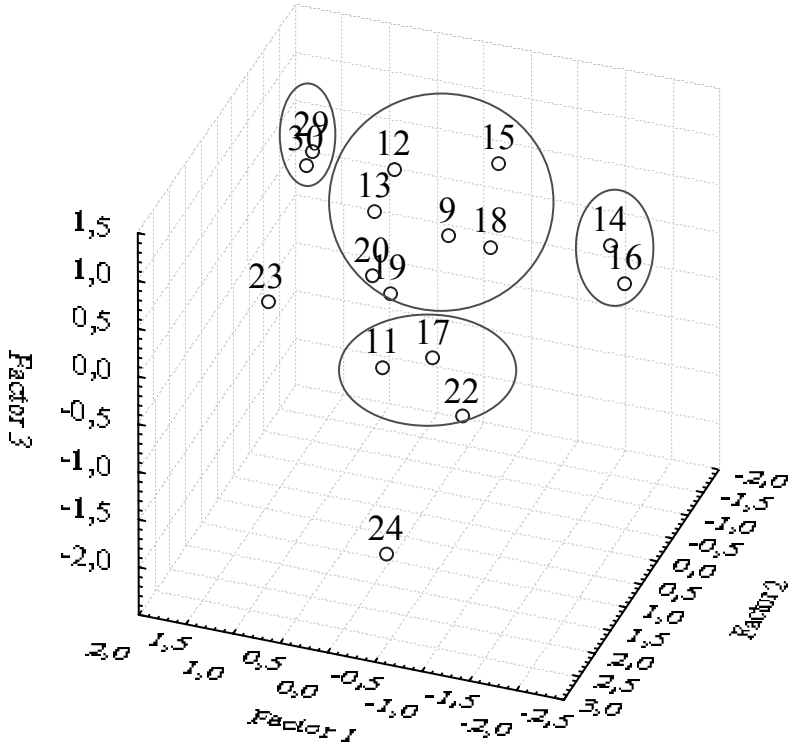


Figura 6.2: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002) en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs

En la **figura 6.2** podemos ver la proyección de las muestras (*scores*) en el espacio tridimensional formado por los tres primeros componentes principales. Al observar dicha representación podemos decir que no hay ningún agrupamiento claro entre las muestras según localización o proximidad entre ellas. Cabe destacar, sin embargo la situación de la muestra 24, la cual se encuentra bastante alejada del resto, lo que indica que no presenta similitud alguna con las demás. También, las muestras codificadas como 9, 12, 13, 15, 18, 19 y 20 (procedentes en su mayoría del interior y margen derecho de la ría) parecen formar una agrupación próxima a las restantes muestras y las muestras 14 y la 16, ambas localizadas en el margen derecho y en la zona interior de la ría.

Al realizar el mismo tratamiento a los resultados de concentración metálica encontrados para las muestras de mejillón recogidas en el segundo muestreo (julio de 2002), se obtiene los porcentajes de variabilidad acumulativa y explicada por cada PC mostrados en la **tabla 6.7**. De igual forma, los pesos de cada variable en los tres primeros PCs, con eigenvalues mayores que la unidad, se muestran en la **tabla 6.8**.

Tabla 6.7: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el segundo muestreo (julio de 2002)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	3,59	29,99	29,99
2	2,57	51,43	21,44
3	2,14	69,27	17,83
4	1,45	81,36	12,09
5	0,83	88,27	6,92
6	0,73	94,39	6,11
7	0,33	97,17	2,78
8	0,20	98,80	1,63
9	0,10	99,67	0,87
10	0,03	99,95	0,28
11	0,005	99,99	0,04
12	0,0007	100,00	0,006

Tabla 6.8: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	0,473	-0,217	-0,060
Ba	0,439	0,153	-0,151
Cd	0,203	0,500	-0133
Co	0,066	-0,321	-0,175
Cr	0,331	-0,368	-0,148
Cu	-0,311	-0,111	-0,465
Fe	0,412	-0,197	-0,147
Mn	-0,097	-0,497	-0,0,053
Ni	-0,211	-0,320	-0,291
Pb	-0,316	-0,103	-0,464
V	-0,175	0,120	0,223
Zn	-0,098	0,125	-0,559

Observando los pesos de las variables para los tres primeros PCs puede verse que las variables Al, Ba y Fe tienen un peso importante en el componente PC 1 (0,473; 0,439 y 0,412), mientras que Cd, Mn, Cr, Co y Ni lo tienen sobre el PC 2 (0,500; -0,497; -0,368; -0,321 y -0,320). En cuanto al componente principal 3, éste va a venir explicado por las variables Zn, Cu y Pb (-0,559; -0,465 y -0,464).

En la **figura 6.3** se muestra el gráfico de *scores* correspondiente a las muestras recogidas durante la segunda campaña de muestreo (julio de 2002).

Puede observarse ciertos agrupamientos entre las muestras, tales como el grupo formado por las muestras 9, 11, 13, 14, 17, 19, 29 y 30. Las muestras que integran este grupo son bastante dispares en cuanto a su localización geográfica (**figura 6.1**), encontrándose algunas en la desembocadura del río Ulla (14, 17, 18), margen derecho de la ría (11, 13) y alrededores de la Illa de Arousa (9, 19, 30).

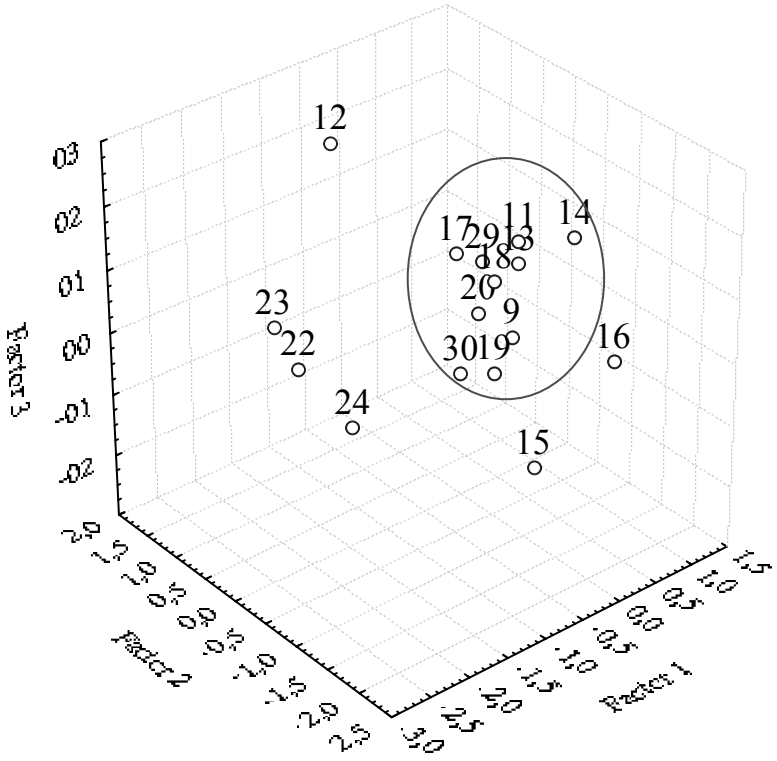


Figura 6.3: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002) en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs

Para el tercer muestreo (febrero de 2003), los resultados de porcentaje de variabilidad acumulativa y explicada por cada PC se recogen en la **tabla 6.9** y los *loadings* de las distintas variables en cada uno de los tres primeros PC (eigenvalue mayor que la unidad) se listan en la **tabla 6.10**.

Al igual en los muestreos anteriores, si nos referimos a los tres primeros componentes principales vemos que el modelo explica un 84% de la variabilidad (información) de la matriz de datos. El PC 1 está formado mayoritariamente por los pesos de las variables Fe, Cr, Mn, Co, Al y Ni (0,362; 0,360; 0,349; 0,345; 0,334 y 0,326), mientras que las variables que muestran mayores *loadings* en el PC 2 son As (0,553), Ba (0,425), Cd (0,423) y Zn (0,371). En cuanto PC 3, éste viene explicado fundamentalmente por Zn (0,556), Cu (0,540) y Pb (0,516).

Tabla 6.9: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el tercer muestreo (febrero de 2003)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	6,79	52,23	52,23
2	2,48	71,30	19,07
3	1,68	84,24	12,94
4	0,90	91,16	6,92
5	0,38	94,12	2,96
6	0,34	96,72	2,59
7	0,20	98,25	1,53
8	0,12	99,16	0,92
9	0,05	99,57	0,41
10	0,04	99,90	0,32
11	0,012	99,99	0,100
12	0,0008	100,00	0,006
13	0,00003	100,00	0,000

Tabla 6.10: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	0,334	0,190	-0,118
As	-0,148	0,553	0,048
Ba	0,250	0,425	-0,089
Cd	-0,233	0,423	0,085
Co	0,345	0,061	-0,088
Cr	0,360	0,104	0,020
Cu	0,213	-0,251	0,540
Fe	0,362	0,162	-0,089
Mn	0,349	0,100	-0,062
Ni	0,326	-0,015	0,009
Pb	0,244	-0,170	0,516
V	0,185	-0,135	-0,286
Zn	-0,044	0,371	0,556

La **figura 6.4** (gráfico de *scores*) ofrece las distintas agrupaciones de muestras de mejillón en el espacio formado por los tres primeros PCs. Observando dicho gráfico se pueden distinguir a grandes rasgos tres agrupaciones. Una primera formada por las muestras 13, 14, 15,

16, 17 y 18, muestras localizadas en su mayoría en la desembocadura del río Ulla; un segundo grupo formado por muestras de mejillón localizadas en el margen derecho de la ría (9, 11 y 29); y un tercer grupo que engloba muestras recogidas en el margen central-izquierdo de la Ría de Arousa (20, 22, 23, 24 y 30). Para este muestreo podemos decir que las muestras de mejillón se agrupan en función de su localización geográfica.

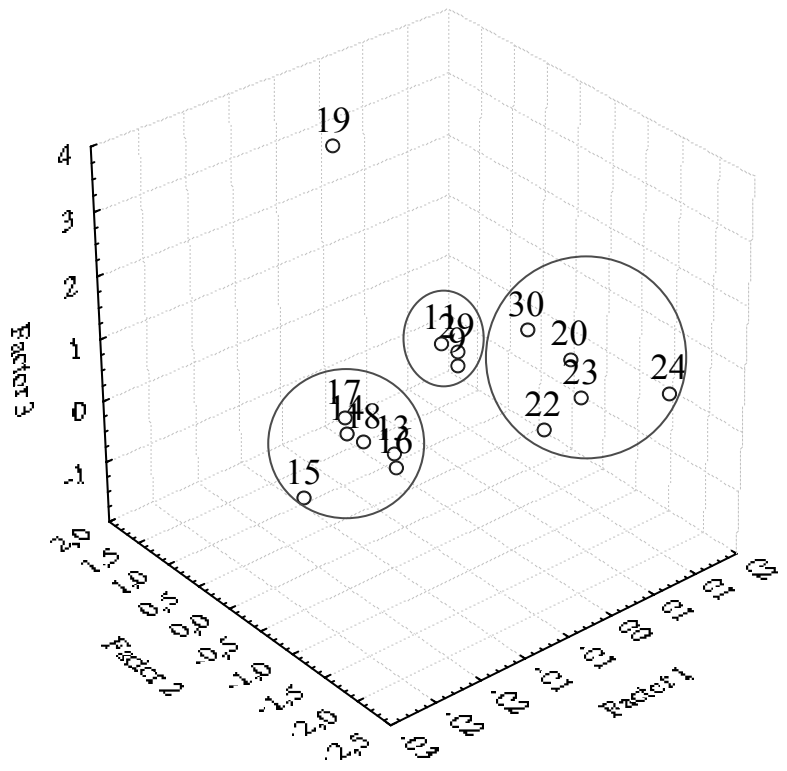


Figura 6.4: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2003) en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs

Para el último muestreo (julio de 2003), tanto los resultados de porcentaje de variabilidad acumulativa y explicada por cada PC, como los *loadings* correspondientes a cada variable en cada uno de los tres primeros componentes (eigenvalues mayores que la unidad), se recogen en las **tablas 6.11** y **6.12**, respectivamente.

Tabla 6.11: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el cuarto muestreo (julio de 2003)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	4,01	33,43	33,43
2	3,68	64,06	30,63
3	1,67	77,95	13,90
4	1,27	88,52	10,57
5	0,61	93,62	5,10
6	0,40	96,93	3,31
7	0,20	98,59	1,66
8	0,09	99,32	0,73
9	0,05	99,78	0,46
10	0,02	99,94	0,16
11	0,008	100,00	0,06
12	0,00002	100,00	0,00

Tabla 6.12: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	-0,078	-0,501	0,042
Ba	0,361	-0,054	0,035
Cd	0,450	0,102	0,254
Co	-0,040	-0,322	0,243
Cr	-0,016	-0,374	0,337
Cu	0,264	-0,340	-0,360
Fe	0,011	-0,508	0,084
Mn	-0,396	-0,225	-0,020
Ni	-0,149	0,008	0,565
Pb	0,262	-0,259	-0,455
V	0,446	-0,004	0,220
Zn	0,376	-0,020	0,220

Observando los resultados se elige trabajar con tres componentes principales ya que con estos se explica un 78% de la variabilidad. En cuanto a los pesos de cada variable en cada uno de los componentes principales, el PC 1 está explicado, fundamentalmente por Cd, V, Mn, Zn y Ba (0,450; 0,446; -0,396; 0,376 y 0,361), el PC 2 por Fe y Al (-0,508 y –0,501) y el PC 3 por Ni y Pb (0,565 y –0,455).

La **figura 6.5** nos muestra los distintos *scores* correspondientes al cuarto muestreo. Como puede verse, existe una agrupación de las muestras 11, 16, 20 y 22 (sin aproximación geográfica entre sí) y otra agrupación dispersa entre las muestras 9, 14, 18, 19, 23, 29 y 30 (fundamentalmente localizadas en la desembocadura del río Ulla y el margen derecho de la ría).

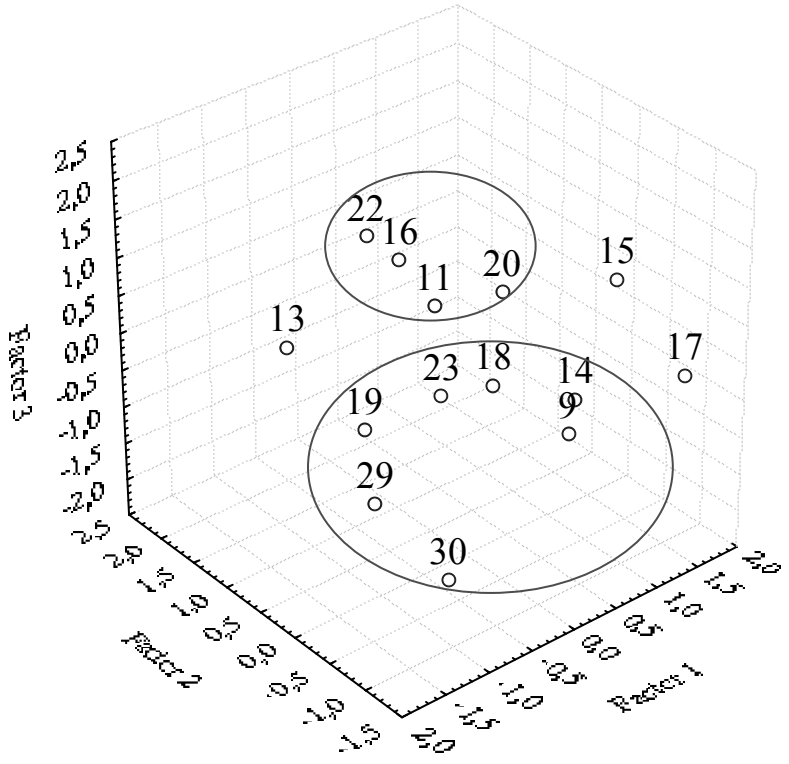


Figura 6.5: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2003) en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs

Por último, si llevamos a cabo un estudio con los datos de los cuatro muestreos vemos, **figura 6.6**, que es imposible ver algún agrupamiento entre las distintas muestras.

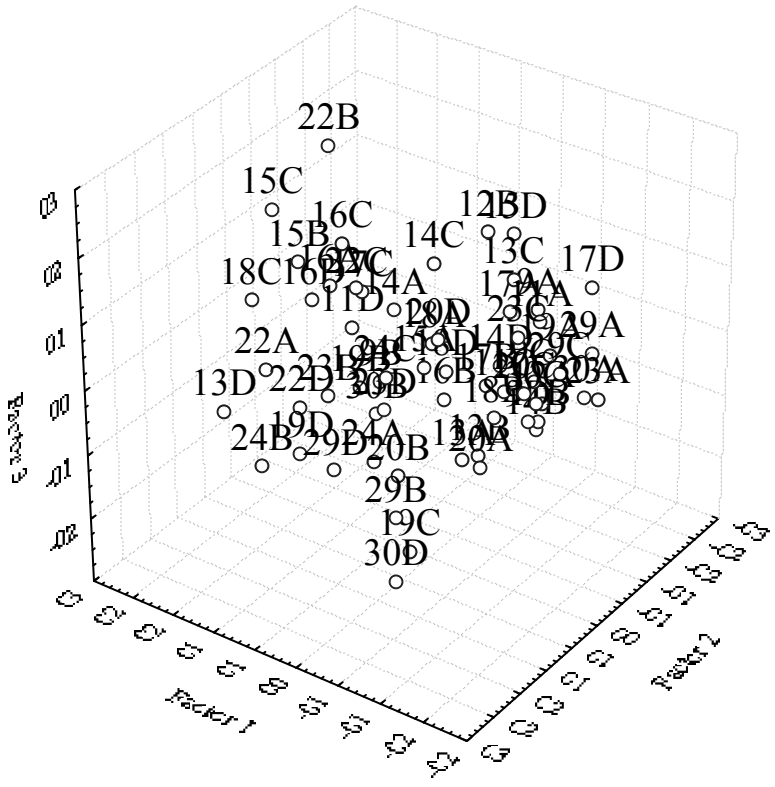


Figura 6.6: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs. (A): muestreo febrero de 2002, (B): muestreo julio de 2002, (C): muestreo febrero de 2003, (D): muestreo julio de 2003

Los porcentajes de variabilidad acumulativa y explicada se recogen en la **tabla 6.13** y los pesos de cada variable en cada uno de los tres PC considerados (eigenvalue mayor que la unidad) en la **tabla 6.14**.

Con tres componentes principales se explica un 70% de la variabilidad existente en la matriz de datos. Por otro lado, los elementos que van a explicar el PC 1 son Fe, Cr y Al (0,484; 0,444 y 0,429), mientras que el PC 2 está formado por Cd, Zn y Mn (0,549, 0,539 y –0,436). Por último, las variables Pb y Cu son los que presentan mayores pesos sobre el PC 3, 0,600 y 0,584 respectivamente.

Tabla 6.13: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC (muestreos febrero y julio de 2002 y febrero y julio de 2003)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	3,46	34,63	34,63
2	2,01	54,76	20,13
3	1,50	69,75	14,99
4	0,10	79,74	9,99
5	0,52	84,95	5,21
6	0,49	89,82	4,88
7	0,45	94,29	4,47
8	0,26	96,89	2,60
9	0,19	98,81	1,92
10	0,12	100,00	1,19

Tabla 6.14: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	0,429	0,067	-0,294
Ba	0,304	0,285	-0,341
Cd	-0,045	0,549	-0,215
Cr	0,444	-0,044	-0,134
Cu	0,287	0,142	0,584
Fe	0,484	0,043	-0,100
Mn	0,316	-0,436	0,082
Ni	0,218	-0,263	-0,081
Pb	0,289	0,198	0,600
Zn	0,026	0,539	0,085

Observando el gráfico de *scores* de la **figura 6.6** podemos ver que las muestras más dispersas se corresponden con las denotadas por *D* (muestras de mejillón relativas al muestreo de julio de 2003). De esta forma, se decidió repetir el estudio quimiométrico pero utilizando únicamente los datos correspondientes a los tres primeros muestreos.

El gráfico de *scores* teniendo en cuenta los tres primeros muestreos se puede ver en la **figura 6.7**. Podemos ver que, en general, las muestras de mejillón se agrupan por campañas de

recogida, existiendo un grupo compacto formado por muestras de la campaña de verano (B: muestras pertenecientes al muestreo de julio de 2002) y un grupo más disperso formado por muestras de las campañas de invierno (A: muestras pertenecientes muestreo de febrero de 2002, y C: muestras pertenecientes muestreo de febrero de 2003).

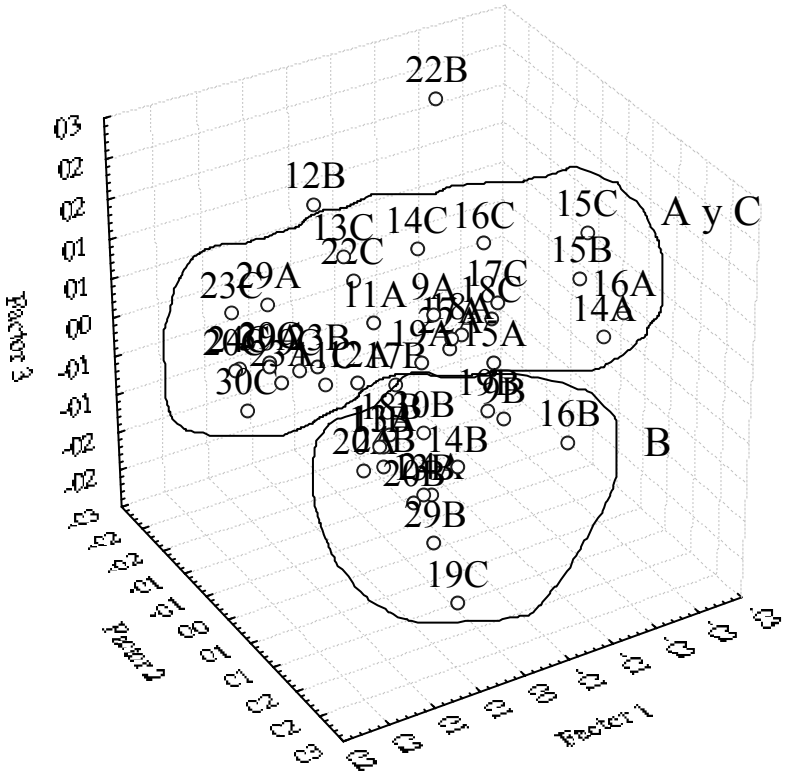


Figura 6.7: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio tridimensional formado por los tres primeros PCs. (A): muestreo febrero de 2002, (B): muestreo julio de 2002, (C): muestreo febrero de 2003

Tabla 6.15: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC(muestreos febrero y julio de 2002 y febrero de 2003)

PC Nº	Eigenvalue	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Diferencia)
1	3,53	35,34	35,34
2	1,90	54,30	18,95
3	1,57	70,02	15,72
4	0,10	79,91	9,90
5	0,.52	85,09	5,17
6	0,51	90,20	5,11
7	0,43	94,46	4,26
8	0,27	97,13	2,67
9	0,17	98,86	1,74
10	0,11	100,00	1,14

Tabla 6.16: *Loadings* de las variables en los tres componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3
Al	0,410	0,176	-0,289
Ba	0,315	0,351	-0,275
Cd	-0,052	0,570	-0,040
Cr	0,445	-0,028	-0,119
Cu	0,275	-0,038	0,602
Fe	0,477	0,094	-0,100
Mn	0,332	-0,429	-0,009
Ni	0,241	-0,255	-0,056
Pb	0,241	0,065	0,610
Zn	0,025	0,507	0,278

Los datos correspondientes a los porcentajes de variabilidad acumulativa y explicada y los referentes a los pesos de cada elemento en los tres primeros PC se recogen en las **tablas 6.15** y **6.16**, respectivamente. Si se trabaja con los tres primeros componentes principales, se logra explicar un 70% de la variabilidad. Los mayores pesos sobre el PC1 lo muestran el Fe (0,477) y el Al (0,410), mientras que para el PC 2 son el Cd (0,570) y el Zn 0,507) y para el PC 3, el Pb (0,610) y el Cu (0,602).

2.6.3-ANÁLISIS DE CLUSTER

El estudio mediante análisis de clusters se realizó para corroborar la similitud entre muestras encontradas mediante los PCA. Muchas veces el uso de Análisis de Componentes Principales no resuelve bien la separación entre grupos, lo que hace necesario el uso de otro tipo de análisis como puede ser el análisis cluster o de conglomerados. Este método de reconocimiento de pautas no supervisado realiza clases con los objetos, así los objetos que más se parezcan entre sí formarán una clase diferenciada del resto. Se empieza considerando cada objeto como un conglomerado de tamaño uno y se comparan las distancias entre objetos, los dos puntos que se encuentran más próximos se unen y forman un conglomerado nuevo y así sucesivamente. El método que se usó para calcular las distancia fue el de la distancia Euclídea, esta distancia se calcula mediante la **ecuación 6.4 [6]** y como método de unión de los datos el método de Ward, que es un método aglomerativo que considera en cada paso la heterogeneidad de todos los posibles cluster **[7]**. Para todo ello se usó el programa estadístico Statgraphics 5.0.

$$d = \sqrt{(x1 - y1)2} + \sqrt{(x2 - y2)2 + ... + \sqrt{(xn - yn)2}} \quad \textbf{(Ec. 6.4)}$$

Los resultados, en forma de dendrogramas, para cada campaña se representan en las **figuras 6.8** a **6.11**. Para el muestreo de febrero de 2002 (**figura 6.8**), si cortamos a una distancia de 60, las agrupaciones que se distinguen son cinco. Una primera formada por las muestras 9, 11, 17 y 19, muestras situadas alrededor de la Illa de Arousa (9 y 19), al margen derecho de la ría (11) y al izquierdo (17). La segunda agrupación o cluster la constituye las muestras 12, 13, 15, 18 y 20 (margen derecho-central); la tercera está formada por las muestras 23, 29 y 30, y por último, la cuarta, por las muestras 14 y 16, muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla. Las muestras 22 y 24, localizadas en la península de O Grove, forman un cluster aparte.

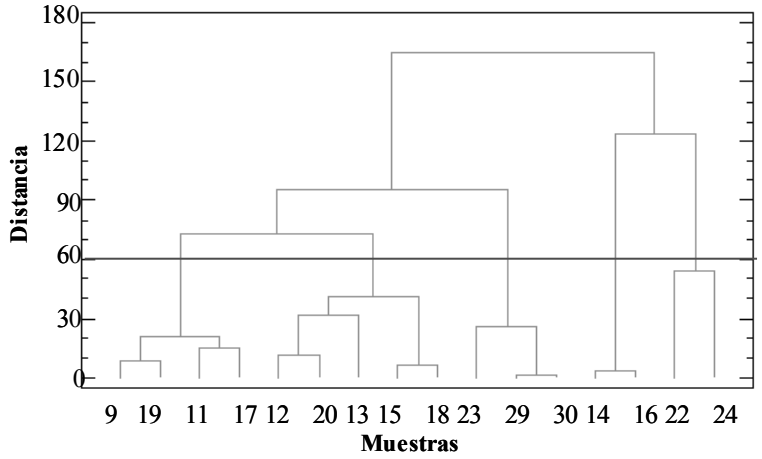


Figura 6.8: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002

Cortando a una distancia de 50 en el dendrograma de la **figura 6.9** (muestreo de julio de 2002), se observan tres clusters. El primero (empezando por la izquierda) formado por las muestras 9, 16, 18, 19, 20 y 30 (desembocadura del río Ulla y alrededores de la Illa de Arousa); el segundo, por las muestras 11, 13, 14 y 17 (margen derecho de la Ría de Arousa, 11, 13 y 14, y margen izquierdo 17) y el tercero, formado por las muestras 23 y 24, muestra situadas en el eje central y en el margen izquierdo de la ría. Cabe destacar la independencia de las muestras 12, 15, 22 y 29.

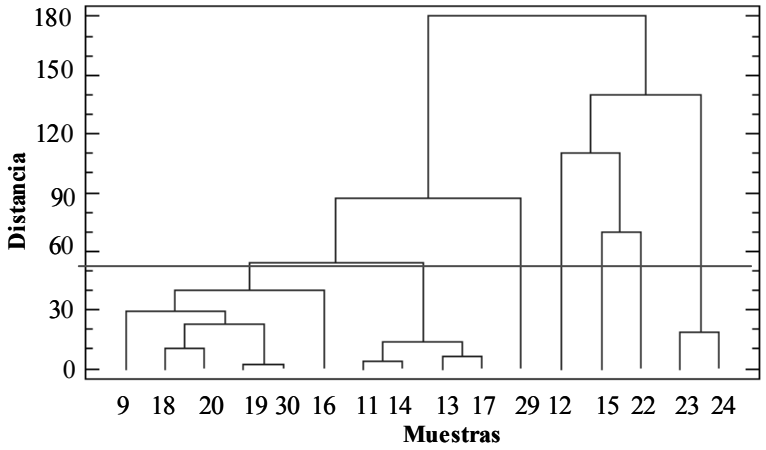


Figura 6.9: Dendrograma correspondiente al muestreo de julio de 2002

Si nos fijamos en el dendrograma correspondiente al tercer muestreo (**figura 6.10**) y cortamos a una distancia de 50, obtenemos cuatro grupos. Empezando por la izquierda, un grupo formado por las muestras 9, 11, 20, 23, 29 y 30 (margen derecho y alrededores de la Illa de Arousa), otro por las muestras 22 y 24 (península de O Grove), un tercero por las muestras 13 y 14 (muestras del margen derecho, bastante próximas entre sí), y un último que está constituido por las muestras 15, 16, 17 y 18 (desembocadura del río Ulla y margen izquierdo de la ría). La muestra 19 parece ser independiente aunque próxima a las muestras 13 y 14 (distancia de 80).

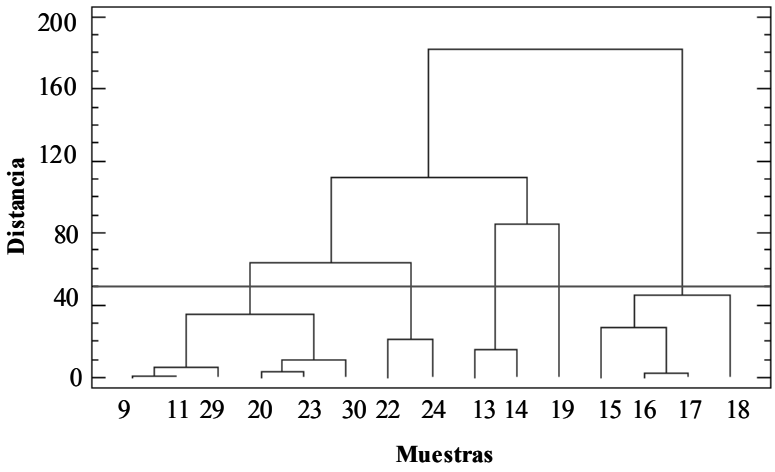


Figura 6.10: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2003

En cuanto al último muestreo, julio de 2003, dendrograma de la **figura 6.11**, se obtienen cuatro agrupaciones si cortamos a una distancia de 70. En la primera nos encontramos con las muestras 9 y 30 (alrededores de la Illa de Arousa). La segunda está formada por las muestras 18, 19, 20, 23 y 29, localizadas en la parte central-izquierda de la ría y rodeando la Illa de Arousa (18, 19, 20 y 23) y al margen derecho de la ría (29). En la tercera agrupación tenemos las muestras 14, 15 y 17 (margen derecho, desembocadura del río Ulla y margen izquierdo), y en la cuarta la 11 y la 16 (margen derecho y desembocadura del río Ulla) y la 13 y 22.

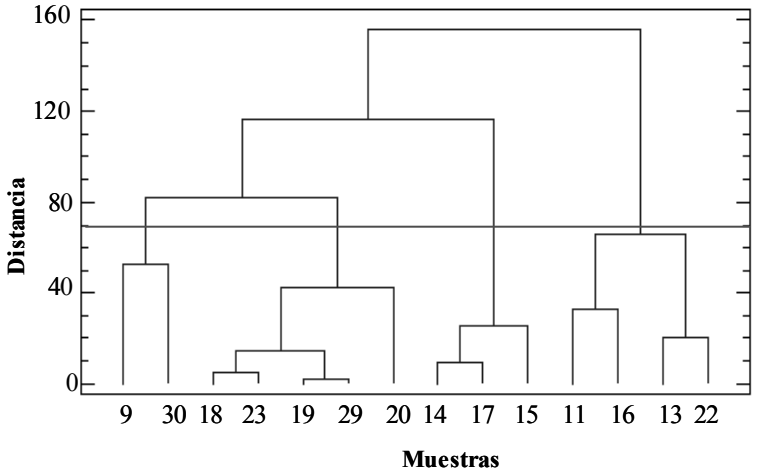


Figura 6.11: Dendrograma correspondiente al muestreo de julio de 2003

Como conclusión, podemos ver que con el análisis de cluster se observan mejor las agrupaciones y/o relaciones existentes entre las muestras de mejillón. Para el caso del segundo muestreo, el cual presenta agrupaciones tras el análisis de componentes principales, cabe decir que el agrupamiento mostrado tras dicho análisis (muestras 9, 11, 13, 14, 17, 19, 29 y 30) coincide con los dos primeros grupos observados tras análisis de cluster, en el que además de estas muestras aparecen a mayores la 16, 18, 20 y 16 y falta la 29. Para el tercer muestreo aunque las agrupaciones obtenidas con ambos tipos de análisis no se corresponden fielmente, las muestras que forman grupos en los clusters están en general dentro de la misma agrupación en los PC.

Tras los resultados llevados a cabo, la clasificación de las muestras de mejillón de batea en función de la concentración de metal no es clara, si bien las muestras cultivadas en la desembocadura del río Ulla y al margen derecho de la ría parecen tener cierta similitud. Este hecho coincide con el movimiento de las corrientes marinas en la Ría de Arousa y con el tiempo de permanencia del agua en la misma, según las cuales la corriente proveniente del mar abierto entra por el margen izquierdo de la ría y sale por el margen derecho arrastrando hacia la derecha las descargas del río Ulla **[8]**. Además, el flujo de agua que entra en la ría es ligeramente menor al flujo de agua que sale, existiendo un estancamiento parcial del agua en el margen derecho de la ría **[3]**. Esto hace que el efecto del río Ulla se manifieste en la zona derecha de la ría.

2.7- ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE LOS NIVELES TOTALES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn ASOCIADO A SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR

En el presente apartado, se exponen los resultados de los niveles totales de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn, y Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociado a sustancias de bajo peso molecular (SBPM) correspondientes a mejillones de batea (**figura 6.1**) muestreados en las campañas de febrero de 2002 y julio de 2002.

Las muestras de mejillón (húmedo y seco, tras un proceso de liofilización) se sometieron al procedimiento de digestión ácida asistida en horno microondas descrito en el Capítulo I. Cada muestra se preparó por triplicado, determinándose la concentración de metales en los digeridos ácidos por FAAS (Cu y Zn) y por ETAAS (Cr, Cd y Pb) según condiciones instrumentales de medida descritas en las **tablas 1.2** a **1.4** del Capítulo I.

Por otra parte, las mismas muestras de mejillón se sometieron al proceso de preparación del extracto citosólico por percusión, según esquema mostrado en el Capítulo IV, y los niveles de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociados a SBPM se determinaron por FAAS (Cu y Zn) y por ETAAS (Cr, Cd y Pb) según condiciones instrumentales de medida descritas en las **tablas 2.9** a **2.11** del Capítulo II.

Los valores de concentración de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn encontrados en cada muestra correspondiente a los distintos muestreos se listan en las **tablas 6.17** a **6.26**. Los resultados están expresados en forma de una media de las concentraciones de los tres digeridos ± la desviación estándar de esas tres concentraciones.

De manera similar, los valores de las fracciones de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociados a SBPM correspondientes a cada uno de los dos muestreos, así como el porcentaje de las fracciones de Cr, Cd, Pb, Cu y Zn asociados a SBPM, según la **ecuación 6.5**, se recogen en las **tablas 6.17** a **6.26**.

$$Porcentaje = \frac{[M]_{SBPM}}{[M]_T} \quad \textbf{(Ec. 6.5)}$$

donde $[M]_{SBPM}$ es la concentración de metal ligado a las sustancias de bajo peso molecular y $[M]_T$ es la concentración de metal total en la muestra seca.

Igualmente, los resultados mostrados en dichas tablas se corresponden con tres determinaciones independientes.

Tabla 6.17: Concentraciones de Cr (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cr asociado a SBPM y porcentaje de Cr asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	**[Cr]/(µg/g) SBPM**	**[Cr]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Cr]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Cr_{SBPM}/Cr_{húmedo}$)**
9	0,010±0,002	0,115±0,007	0,515±0,050	8,7±2,8
11	0,022±0,006	0,095±0,001	0,583±0,037	23,2±6,8
12	0,027±0,003	0,113±0,004	0,666±0,022	23,9±5,2
13	0,012±0,001	0,127±0,019	0,535±0,090	9,5±3,8
14	0,022±0,009	0,190±0,017	1,072±0,105	11,6±5,9
15	0,017±0,001	0,214±0,019	1,750±0,101	7,9±2,4
16	0,029±0,001	0,294±0,010	2,20±0,220	9,9±1,9
17	0,020±0,005	0,195±0,018	0,887±0,064	10,3±4,1
18	0,016±0,003	0,178±0,006	1,101±0,020	9,0±2,4
19	0,022±0,001	0,116±0,012	0,705±0,025	19,0±6,2
20	0,012±0,004	0,075±0,013	0,630±0,035	16,0±8,5
22	0,010±0,001	0,093±0,017	0,660±0,028	10,8±4,7
23	0,011±0,003	0,121±0,018	0,468±0,052	9,9±4,7
24	0,021±0,007	0,136±0,012	0,612±0,029	15,4±6,9
29	0,019±0,002	0,125±0,011	0,457±0,004	15,2±4,8
30	0,015±0,001	0,142±0,018	0,543±0,056	10,6±3,5

Tabla 6.18: Concentraciones de Cd (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cd asociado a SBPM y porcentaje de Cd asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	[Cd]/(µg/g) SBPM	[Cd]/(µg/g) Total Húmedo	[Cd]/(µg/g) Total Seco	Porcentaje % ($Cd_{SBPM}/Cd_{húmedo}$)
9	0,020±0,001	0,071±0,002	0,391±0,024	28,2±1,6
11	0,010±0,005	0,101±0,002	0,473±0,068	9,9±5,0
12	0,024±0,004	0,078±0,000	0,434±0,031	30,8±5,1
13	0,016±0,001	0,069±0,005	0,549±0,035	23,2±2,2
14	0,016±0,001	0,082±0,001	0,310±0,012	19,5±1,2
15	0,016±0,001	0,068±0,002	0,445±0,020	23,5±1,6
16	0,036±0,001	0,136±0,026	0,459±0,035	26,5±5,1
17	0,008±0,001	0,079±0,005	0,437±0,018	10,1±1,4
18	0,021±0,000	0,099±0,006	0,565±0,033	21,2±1,3
19	0,021±0,000	0,066±0,000	0,561±0,011	31,8±0
20	0,020±0,001	0,093±0,010	0,665±0,044	21,5±2,6
22	0,020±0,002	0,093±0,001	0,614±0,021	21,5±2,2
23	0,028±0,001	0,103±0,004	0,812±0,047	27,2±1,4
24	0,029±0,001	0,076±0,001	0,974±0,005	38,2±1,4
29	0,029±0,008	0,096±0,002	0,629±0,019	30,2±8,4
30	0,027±0,004	0,122±0,001	0,726±0,023	22,1±13,3

Tabla 6.19: Concentraciones de Pb (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Pb asociado a SBPM y porcentaje de Pb asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	**[Pb]/(µg/g) SBPM**	**[Pb]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Pb]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Pb_{SBPM}/Pb_{húmedo}$)**
9	0,026±0,003	0,311±0,006	0,596±0,030	8,4±1,0
11	0,020±0,001	0,210±0,001	0,651±0,001	9,5±0,5
12	0,058±0,001	0,106±0,007	0,902±0,062	54,7 ±3,7
13	0,034±0,001	0,332±0,003	0,631±0,128	10,2±0,3
14	0,025±0,001	0,072±0,007	0,513±0,000	34,7±3,7
15	0,054±0,006	0,290±0,020	1,553±0,001	18,6±2,4
16	0,075±0,005	0,139±0,006	0,533±0,030	54,0±4,3
17	0,059±0,001	0,332±0,001	0,924±0,202	17,8±0,3
18	0,056±0,003	0,354±0,009	0,811±0,086	15,8±0,9
19	0,026±0,002	0,150±0,050	1,389±0,182	17,3±5,9
20	0,046±0,004	0,203±0,001	0,722±0,002	22,7±2,0
22	0,035±0,001	0,160±0,010	1,549±0,189	21,9±1,5
23	0,032±0,004	0,315±0,003	0,870±0,003	10,2±1,3
24	0,047±0,009	0,219±0,001	1,161±0,091	21,5±4,1
29	0,033±0,001	0,160±0,020	1,193±0,140	20,6±2,7
30	0,027±0,007	0,730±0,070	0,948±0,053	3,7±1,0

Tabla 6.20: Concentraciones de Cu (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cu asociado a SBPM y porcentaje de Cu asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	**[Cu]/(µg/g) SBPM**	**[Cu]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Cu]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Cu_{SBPM}/Cu_{húmedo}$)**
9	0,315±0,003	0,760±0,020	7,39±0,58	41,4±1,2
11	0,270±0,001	0,760±0,010	6,08±0,68	35,5±0,5
12	0,370±0,010	0,655±0,006	6,36±0,20	56,5±1,6
13	0,299±0,003	0,507±0,009	7,01±0,28	59,0±1,2
14	0,276±0,001	0,830±0,060	6,54±1,78	33,3±2,4
15	0,245±0,002	0,770±0,020	14,59±0,66	31,8±0,9
16	0,320±0,010	0,940±0,020	9,96±0,81	34,0±1,3
17	0,206±0,005	0,860±0,050	7,37±0,23	24,0±1,5
18	0,198±0,002	0,785±0,006	7,99±0,37	25,2±0,3
19	0,180±0,010	0,740±0,050	7,08±0,95	24,3±2,1
20	0,315±0,002	0,560±0,020	8,29±0,68	56,3±2,0
22	0,179±0,004	0,745±0,009	8,31±0,31	24,0±0,6
23	0,301±0,007	0,720±0,050	6,43±0,54	41,8±3,1
24	0,280±0,030	0,660±0,007	9,04±0,58	42,4±4,6
29	0,233±0,007	0,536±0,006	5,27±0,19	43,5±1,4
30	0,330±0,008	0,567±0,002	5,72±0,44	58,2±1,2

Tabla 6.21: Concentraciones de Zn (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Zn asociado a SBPM y porcentaje de Zn asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo febrero de 2002)

Muestra Nº	**[Zn]/(µg/g) SBPM**	**[Zn]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Zn]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Zn_{SBPM}/Zn_{húmedo}$)**
9	2,1±0,3	11,3±0,6	37,96±3,56	18,6±2,8
11	2,7±0,2	15,7±0,7	110,56±6,71	17,2±1,5
12	3,2±0,1	7,0±0,9	32,75±4,54	45,7±6,0
13	1,5±0,5	8,0±1,0	93,04±1,63	18,8±6,7
14	2,1±0,1	10,0±2,0	58,18±3,15	21±4,3
15	1,7±0,2	9,9±0,4	160,84±15,38	17,2±2,1
16	3,3±0,2	8,4±0,6	115,43±14,98	39,3±3,7
17	1,7±0,1	11,2±0,3	114,33±5,99	15,2±1,0
18	2,0±0,1	12,4±0,8	101,12±3,31	16,1±1,3
19	2,24±0,04	9,3±0,5	146,03±6,96	24,1±1,4
20	2,3±0,2	11,34±0,06	154,16±15,47	20,3±1,8
22	1,60±0,06	9,2±0,2	147,84±3,29	17,4±0,8
23	1,89±0,05	11,0±0,1	111,32±1,70	17,2±0,5
24	1,9±0,3	10,9±0,6	185,34±1,52	17,4±2,9
29	3,4±0,2	7,4±0,2	14,58±1,07	45,9±3,0
30	2,96±0,07	9,6±0,7	21,65±2,20	30,8±2,4

Tabla 6.22: Concentraciones de Cr (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cr asociado a SBPM y porcentaje de Cr asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	**[Cr]/(µg/g) SBPM**	**[Cr]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Cr]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Cr_{SBPM}/Cr_{húmedo}$)**
9	0,020±0,003	0,056±0,001	0,734±0,019	35,7±5,4
11	0,025±0,003	0,082±0,003	0,518±0,009	30,5±3,8
12	0,021±0,001	<LD	0,319±0,044	-
13	0,023±0,001	0,055±0,001	0,497±0,040	41,8±2,0
14	0,022±0,004	<LD	0,469±0,031	-
15	0,015±0,004	0,054±0,001	0,703±0,043	27,8±7,4
16	0,034±0,001	0,085±0,007	0,554±0,029	40,0±3,5
17	0,010±0,003	0,185±0,001	0,326±0,013	5,4±1,6
18	0,016±0,001	0,048±0,003	0,375±0,001	33,3±2,9
19	0,012±0,002	0,207±0,039	0,441±0,009	5,8±1,5
20	0,033±0,001	0,042±0,002	0,272±0,027	78,6±4,4
22	0,017±0,004	0,183±0,011	0,776±0,052	9,3±2,2
234	0,030±0,006	0,079±0,005	0,500±0,023	38,0±8,0
24	0,028±0,004	0,137±0,007	0,498±0,017	20,4±3,1
29	0,025±0,003	<LD	0,267±0,027	-
30	0,026±0,005	0,223±0,004	0,502±0,037	11,7±2,3

Tabla 6.23: Concentraciones de Cd (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cd asociado a SBPM y porcentaje de Cd asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	**[Cd]/(µg/g) SBPM**	**[Cd]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Cd]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Cd_{SBPM}/Cd_{húmedo}$)**
9	0,032±0,001	0,111±0,009	1,036±0,108	28,8±2,5
11	0,035±0,001	0,101±0,006	2,038±0,063	34,7±2,3
12	0,036±0,002	0,072±0,006	1,601±0,052	50,0±5,0
13	0,024±0,001	0,065±0,004	1,125±0,111	36,9±2,7
14	0,014±0,001	<LD	0,969±0,009	-
15	0,023±0,002	0,052±0,002	0,892±0,002	44,2±4,2
16	0,014±0,001	0,035±0,007	0,847±0,095	40,0±8,5
17	0,014±0,001	0,117±0,000	0,372±0,047	12,0±0,9
18	0,011±0,001	<LD	0,516±0,023	-
19	0,019±0,001	0,075±0,005	1,574±0,097	25,3±1,7
20	0,057±0,001	<LD	0,691±0,026	-
22	0,028±0,007	0,146±0,014	1,750±0,037	19,2±5,1
23	0,033±0,003	0,211±0,040	2,319±0,177	15,6±3,3
24	0,045±0,003	0,106±0,009	1,35±0,20	42,5±4,6
29	0,032±0,003	0,054±0,003	1,170±0,141	59,3±6,5
30	0,028±0,006	0,145±0,010	0,890±0,063	19,3±4,3

Tabla 6.24: Concentraciones de Pb (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Pb asociado a SBPM y porcentaje de Pb asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	**[Pb]/(µg/g) SBPM**	**[Pb]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Pb]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Pb_{SBPM}/Pb_{húmedo}$)**
9	0,019±0,000	0,569±0,154	0,855±0,028	3,3±0,9
11	0,033±0,002	<LD	0,630±0,040	-
12	0,057±0,003	0,378±0,018	0,600±0,044	15,1±1,1
13	0,047±0,005	0,211±0,040	0,429±0,030	22,2±4,8
14	0,035±0,002	<LD	0,682±0,090	-
15	0,048±0,003	0,278±0,080	0,797±0,036	17,3±5,1
16	0,049±0,004	0,381±0,056	0,523±0,031	12,9±2,2
17	0,054±0,007	<LD	0,496±0,051	-
18	0,031±0,001	0,387±0,107	0,604±0,093	8,0±2,1
19	0,028±0,008	0,709±0,067	0,686±0,033	3,9±1,2
20	0,032±0,003	0,284±0,065	0,401±0,052	11,3±2,8
22	<LD	1,20±0,15	1,217±0,097	-
23	0,022±0,004	0,723±0,097	1,072±0,089	3,0±0,7
24	0,046±0,007	0,404±0,021	0,975±0,081	11,4±5,9
29	0,040±0,005	0,079±0,000	0,518±0,030	50,6±6,3
30	0,034±0,006	0,271±0,065	0,816±0,042	12,5±3,7

Tabla 6.25: Concentraciones de Cu (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Cu asociado a SBPM y porcentaje de Cu asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	**[Cu]/(µg/g) SBPM**	**[Cu]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Cu]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Cu_{SBPM}/Cu_{húmedo}$)**
9	<LD	0,99±0,05	3,59±0,21	-
11	0,12±0,01	1,29±0,16	3,26±0,27	9,3±1,4
12	<LD	1,32±0,14	2,50±0,27	-
13	0,11±0,01	0,95±0,08	3,73±0,26	11,6±1,4
14	0,13±0,02	1,63±0,18	3,83±0,38	8,0±1,5
15	0,16±0,02	1,89±0,24	3,47±0,39	8,5±1,5
16	0,11±0,01	1,17±0,14	4,81±0,38	9,4±1,4
17	0,08±0,00	1,04±0,11	2,44±0,22	7,7±0,8
18	0,111±0,008	1,04±0,11	2,69±0,39	10,7±1,4
19	0,104±0,009	1,46±0,20	3,46±0,01	7,1±1,2
20	0,18±0,05	0,62±0,09	3,59±0,22	29,0±9,1
22	0,14±0,00	0,90±0,16	3,47±0,39	15,6±2,8
23	<LD	0,44±0,09	3,21±0,22	-
24	0,10±0,00	2,27±0,15	4,03±0,26	4,4±0,3
29	0,084±0,009	0,64±0,09	5,19±0,28	13,1±2,3
30	<LD	1,65±0,10	3,26±0,27	-

Tabla 6.26: Concentraciones de Zn (en peso húmedo y en peso seco), concentraciones de Zn asociado a SBPM y porcentaje de Zn asociado a las SBPM en muestras de mejillón de batea (muestreo julio de 2002)

Muestra Nº	**[Zn]/(µg/g) SBPM**	**[Zn]/(µg/g) Total Húmedo**	**[Zn]/(µg/g) Total Seco**	**Porcentaje % ($Zn_{SBPM}/Zn_{húmedo}$)**
9	3,39±0,98	9,42±2,77	98,24±1,24	36,0±14,8
11	0,96±0,14	8,48±1,68	87,12±1,85	11,3±2,8
12	4,23±0,36	9,37±1,50	86,35±0,70	45,1±8,2
13	1,19±0,04	11,22±0,69	94,41±1,76	10,6±0,7
14	0,57±0,06	11,76±1,77	61,82±2,90	4,9±0,9
15	0,66±0,09	12,56±1,09	69,94±3,24	5,3±0,9
16	0,63±0,05	11,08±1,24	58,94±3,66	5,7±0,8
17	0,46±0,07	7,49±0,72	49,72±7,75	6,1±1,1
18	1,15±0,15	3,64±1,01	72,91±1,65	31,5±9,7
19	0,83±0,33	15,81±0,92	118,19±8,68	5,3±2,1
20	2,66±0,32	8,21±1,24	96,42±4,15	32,4±4,9
22	1,60±0,31	26,13±1,89	71,26±4,49	6,1±0,5
23	1,75±0,42	10,85±0,63	86,89±2,30	16,1±4,0
24	0,90±0,22	18,00±0,72	143,42±6,69	5,0±1,2
29	0,71±0,07	7,87±1,26	56,76±4,78	9,0±1,7
30	2,42±0,17	24,39±4,45	125,07±3,40	9,9±1,9

2.7.1- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Previo a la aplicación de las técnicas de reconocimiento de pautas no supervisados, los valores de las distintas concentraciones se normalizaron según la transformación valor central-rango medio expuesta al comienzo del presente capítulo.

2.7.1.1- NIVELES TOTALES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn (concentración en peso seco)

En las **tablas 6.27** y **6.28** podemos ver el porcentaje de variabilidad acumulativa y explicada por los distintos PC para los muestreos de febrero de 2002 y julio de 2002, respectivamente.

Tabla 6.27: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el primer muestreo (febrero de 2002)

PC Nº	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Explicada)
1	52,66	52,66
2	77,05	24,39
3	88,74	11,69
4	98,33	9,59
5	100,00	1,67

Tabla 6.28: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el segundo muestreo (julio de 2002)

PC Nº	Metal total en peso seco (Acumulativa)	Metal total en peso seco (Explicada)
1	47,94	47,94
2	66,17	18,23
3	83,58	17,41
4	95,68	12,10
5	100,00	4,32

Se puede ver que con dos componentes principales, en el caso del primer muestreo, se explica un porcentaje de variabilidad adecuado. El PC 1 explica un 53,0% mientras que el PC 2 un

24,4%. Para el segundo muestreo el primer PC explica un 47,9% y el segundo un 18,2%. Con más componentes la variabilidad explicada no es mucho mayor, por lo que nos quedamos, pues, con dos componentes principales.

El peso de cada variable en los PC lo podemos observar en la **tabla 6.29**.

Tabla 6.29: *Loadings* de las variables en los dos componentes principales

Variable	Muestreo febrero de 2002		Muestreo julio de 2002	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Cr	0,631	-0,530	0,521	0,457
Cd	0,177	0,443	0,438	-0,239
Pb	0,358	0,589	0,623	0,011
Cu	0,598	-0,120	0,130	0,606
Zn	0,292	0,401	0,363	-0,606

Para el muestreo de febrero de 2002, el peso de la variable Cu es mayor en el componente principal uno (0,598), mientras que las variables Pb, Cd y Zn explican el componente principal dos (0,589, 0,443 y 0,401 respectivamente). El Cr es la única variable que presenta pesos importantes en los dos PC (0,631 y -0,530). Cabe decir que los valores de los residuales fueron despreciables para todos los puntos, con lo cual en el estudio de PCA se han considerado todas las muestras.

En el muestreo de julio de 2002, el Pb y el Cd tienen más peso sobre el componente principal uno (0,623 y 0,438), y el Cu y Zn (0,606 y –0,606) sobre el PC2. Al igual que en el primer muestreo, el Cr presenta pesos considerables en los dos componentes principales.

En las **figuras 6.12** y **6.13** se muestran los gráficos de *scores* para ambos muestreos. Para el muestreo de febrero de 2002 (**figura 6.12**) se observa un agrupamiento formado por las muestras 19, 20, 22, 23, 24, 29 y 30, situadas en el cuarto cuadrante de la gráfica de *scores*, que se corresponden con muestras localizadas alrededor de la Illa de Arousa (eje central de la ría); y un último grupo donde se encuentran las muestras 9, 11, 12, 13, 14, 17 y 18 (situadas en el tercer cuadrante de la gráfica de *scores*) que corresponden en su mayoría a muestras localizadas en el margen derecho de la ría. Finalmente, las muestras 15 y 16 (muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla) no tienen relación con el resto de las muestras.

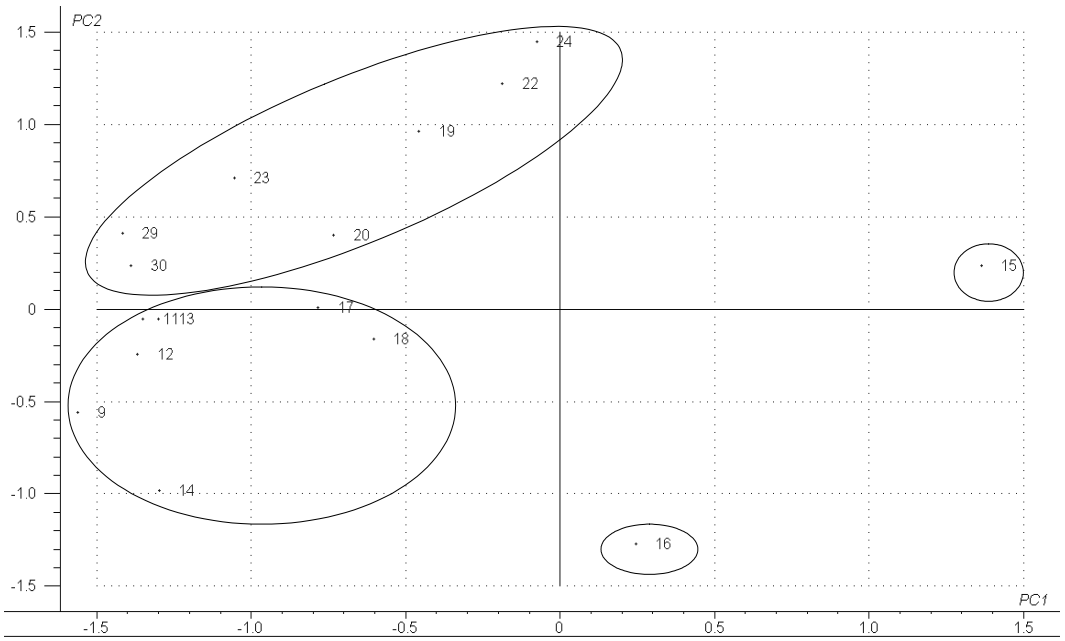


Figura 6.12: Gráfico de scores para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (febrero 2002)

Para el segundo muestreo (**figura 6.13**) tenemos tres agrupaciones; la primera situada en el primer cuadrante de la gráfica de *scores*, en la que nos encontramos con las muestras 14, 16 y 29, muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla y en el margen derecho de la ría. A la segunda agrupación pertenecen las muestras 12, 13, 17, 18 y 20, son muestras localizadas tanto al margen derecho (12, 13) como al izquierdo (17, 18). El tercer grupo de muestras está formado por los puntos de muestreo 9, 11, 15, 19, 22, 23, 24 y 30, en general son muestras localizadas en las proximidades de la península de O Grove y en la Illa de Arousa, menos el punto 15 y el 11. Podemos decir que estos grupos no son claramente diferenciables, que no hay una distribución clara ya que los puntos se encuentran bastante dispersos en las distintas agrupaciones.

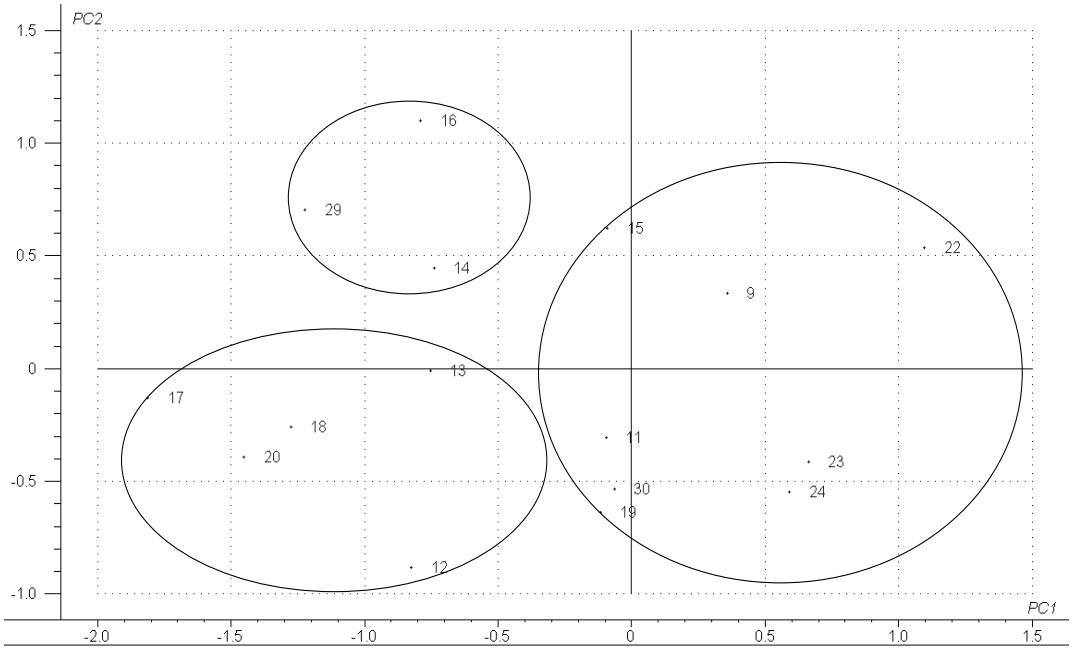


Figura 6.13: Gráfico de scores para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (julio 2002)

Cuando se emplea el contenido total de metal (Cr, Cd, Pb, Cu y Zn), como variable discriminante, las muestras del primer muestreo se agrupan en función de la proximidad a la desembocadura del río Ulla, existiendo un primer grupo formado por las muestras 15 y 16, muestras cercanas a la desembocadura del Ulla y que presentan concentraciones de metal total mayores (para todos los metales menos para el Cd). Un segundo y tercer grupo, formados por muestras alejadas de la desembocadura y localizadas principalmente al margen derecho de la ría y cercanos a la Illa de Arousa, ofrecen un contenido total de metal menor. En el caso del segundo muestreo las agrupaciones no están tan claras al usar esta variable como discriminante, ya que existe bastante dispersión. Cabe destacar que las concentraciones de metal total presente en las muestras de mejillón disminuyen al pasar de la estación de verano a la de invierno. Esto ocurre para todos los metales estudiados menos para el Cd en el que se observa un ligero aumento.

2.7.1.2- NIVELES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn LIGADO A LAS SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR

En las **tablas 6.30** y **6.31** se puede ver el porcentaje de variabilidad acumulativa y explicada por cada PC en los dos muestreos.

Tabla 6.30: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el primer muestreo (febrero de 2002)

PC Nº	Metal ligado a SBPM (Acumulativa)	Metal ligado a SBPM (Explicada)
1	49,59	49,59
2	70,88	21,32
3	85,24	14,36
4	95,81	10,57
5	100,00	4,19

Tabla 6.31: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el segundo muestreo (julio de 2002)

PC Nº	Metal ligado a SBPM (Acumulativa)	Metal ligado a SBPM (Explicada)
1	53,47	53,47
2	73,57	20,01
3	88,73	15,16
4	97,79	9,06
5	100,00	2,21

Como se puede ver, con dos componentes principales se consigue explicar un porcentaje de variabilidad adecuado. A medida que aumenta el número de PCs el aumento del porcentaje se hace menos acusado. Para el muestreo de febrero de 2002, con un PC 1 se explica un 49,6% de la variabilidad y con el PC 2 un 21,3%; mientras que para el muestreo de julio de 2002, con el PC1 tenemos un 53,5% de la variabilidad y con el PC2 un 20,0%.

Los pesos (*loadings*) para cada variable sobre los dos primeros componentes principales se recogen en la **tabla 6.32**.

Tabla 6.32: *Loadings* de las variables en los dos componentes principales

Variable	Muestreo febrero de 2002		Muestreo julio de 2002	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Cr-SBPM	0,525	0,406	-0,019	-0,295
Cd-SBPM	0,332	-0,240	0,013	-0,575
Pb-SBPM	0,365	0,612	0,050	0,071
Cu-SBPM	0,326	-0,570	0,990	0,078
Zn-SBPM	0,611	-0,280	0,018	-0,776

Para las muestras pertenecientes al muestreo de febrero de 2002 puede verse que las variables Cr-SBPM, Cd-SBPM y el Zn-SBPM poseen un gran peso en el componente principal uno (0,525, 0,332 y 0,611) mientras que el PC 2 está formado principalmente por las variables Pb-SBPM y Cu-SBPM (0,612, -0,570). En este caso los valores de los residuales han sido despreciables para todas las muestras, considerándose así todos los puntos en el estudio.

Para el muestreo de julio de 2002, el PC 1 viene explicado por el Cu-SBPM (0,990) y el PC 2 por el Zn-SBPM y el Cd-SBPM(-0,776, -0,575).

En las **figuras 6.14** y **6.15** se muestran los gráficos de *scores* correspondientes a ambos estudios de PCA. Para las muestras de la campaña de febrero de 2002 (**figura 6.14**) se distinguen tres agrupaciones, la primera formada por las muestras 12, 16, 29 y 30 (situadas entre el primer y el segundo cuadrante), muy dispersas entre sí, lo que indica que no hay mucha similitud entre las mismas. Éstas están localizadas al margen derecho de la ría y en la Illa de Arousa (muestra del punto 30). Otro grupo que se observa es el formado por las muestras 15, 17, 18, 19, 22 y 24, situadas en el cuarto cuadrante y localizadas en el margen izquierdo-central de la ría. Finalmente, se observa un agrupamiento constituido por las muestras 9, 11, 13, 14, 20 y 23, situadas en el tercer cuadrante y localizadas en el margen derecho-central de la ría.

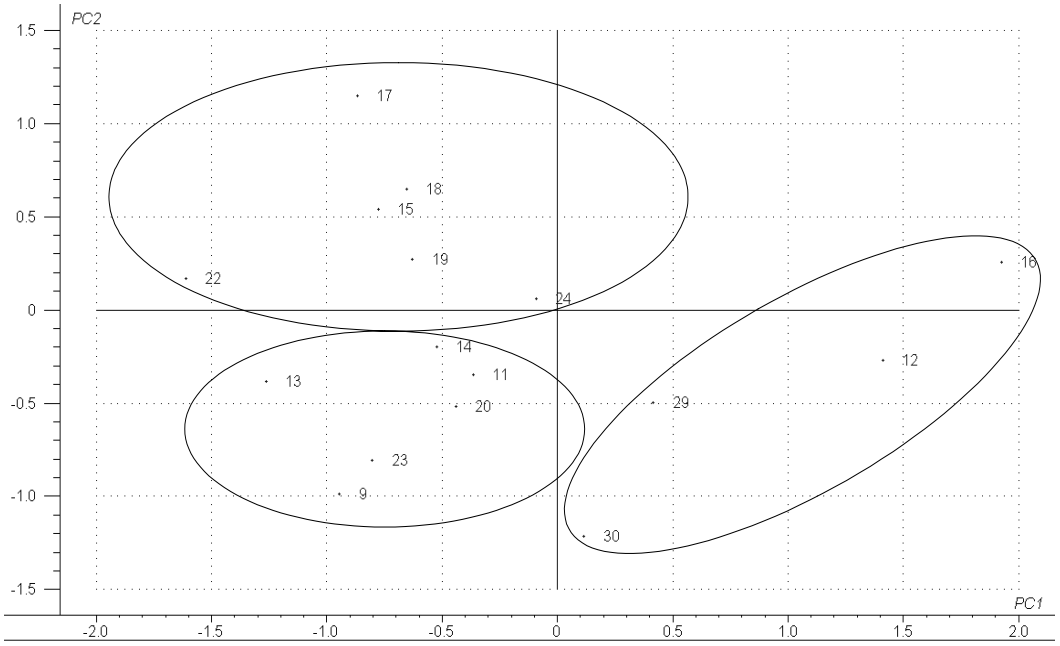


Figura 6.14: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (febrero 2002)

En muestreo de julio de 2002, **figura 6.15**, se observa una agrupación formada por las muestras 9, 12, 23 y 30, localizadas alrededor de la Illa de Arousa (9, 23 y 30) y al margen derecho de la ría (12). Un segundo grupo es el formado por las muestras 11, 13, 22, 24 y 29, muestras del margen derecho de la ría (11, 13 y 29) y del izquierdo (22 y 24). Finalmente, se puede ver un grupo formado por las muestras 14, 15, 16, 17, 18 y 19, muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla y en el margen izquierdo del estuario

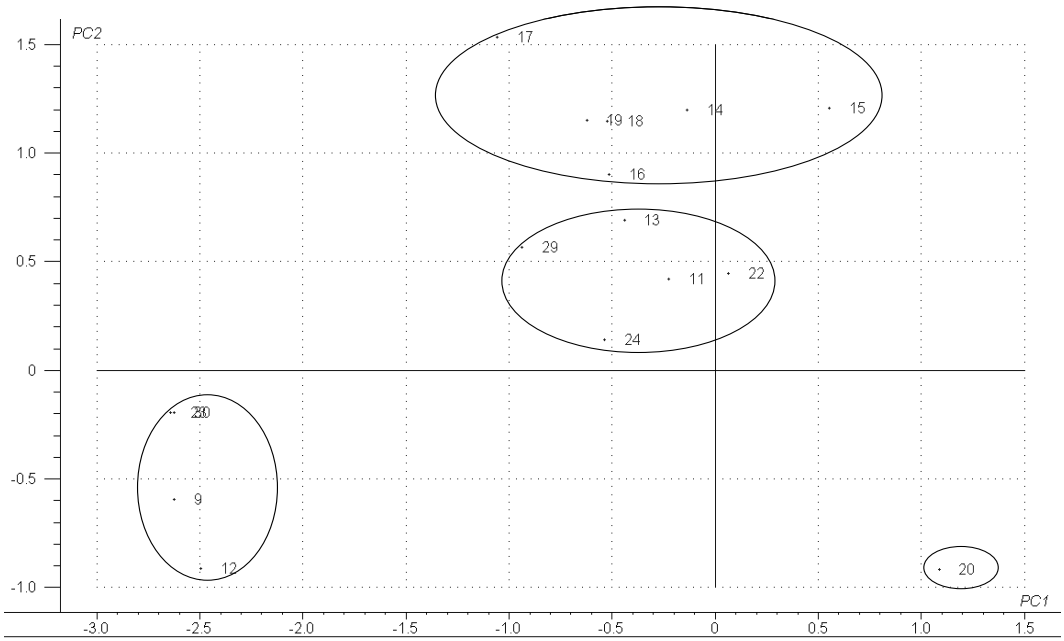


Figura 6.15: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (julio 2002)

Como puede verse, cuando se emplea el contenido de metal ligado a las SBPM, observamos para el primer muestreo tres agrupamientos que no obedecen al valor (mayor o menor) de los contenidos, e incluso a criterios de proximidad geográfica a puertos o núcleos de población. Sin embargo, puede verse un grupo de muestras (15, 17, 18, 19, 22 y 24) diferenciado claramente de otro grupo compacto (9, 11, 13, 14, 20 y 23), el primero está formado principalmente por muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla y al margen izquierdo; mientras que el segundo grupo pertenece a muestras localizadas en el margen derecho central de la ría. Esto puede deberse a las corrientes marinas, las cuales se distribuyen en la Ría de Arousa de forma que entran por el margen izquierdo y salen por el derecho, siendo el caudal de salida menor que el de entrada. Ello implica un estancamiento del contaminante en el margen derecho de la ría, pudiendo estar relacionado con la mayor biosíntesis de SBPM en el mejillón.

En el caso del segundo muestreo, también tenemos tres agrupaciones que al igual que para el primero no corresponden a criterios de mayor o menor concentración de metal. Cabe destacar que el grupo formado por las muestras 9, 12, 23 y 30 son muestras situadas alrededor de

la Illa de Arousa, menos la 12. Su asociación puede estar relacionada con la acumulación de metal debido a la situación de los diferentes puertos pesqueros en la propia isla. Otro grupo a destacar es el formado por las muestras 14, 15, 16, 17, 18 y 19, localizadas en la desembocadura del río Ulla y al margen izquierdo de la ría (pero próximos a la desembocadura de dicho río), lo cual implica acumulación de metal en esta zona proveniente de industrias situadas río arriba. Es importante resaltar que la concentración de metal ligado a las SBPM disminuye estacionalmente de invierno a verano menos para el Cr y el Cd en el se ve un ligero ascenso, aunque no para todos los puntos.

2.7.1.3- PORCENTAJES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn LIGADO A LAS SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Para tener una mejor aproximación sobre la cantidad de metal ligado a las sustancias de bajo peso molecular en función del contenido total de metal, se estableció la relación en porcentaje del metal ligado a las sustancias de bajo peso molecular según la **ecuación 6.5**.

Teniendo en cuenta el porcentaje anteriormente descrito, las **tablas 6.33** y **6.34** muestran la variabilidad explicada para cada PC y acumulativa, en ambos muestreos.

Tabla 6.33: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el primer muestreo (febrero de 2002)

PC Nº	Metal ligado a SBPM (Acumulativa)	Metal ligado a SBPM (Explicada)
1	56,74	56,74
2	78,65	21,91
3	87,98	9,33
4	94,92	6,94
5	100,00	5,08

Tabla 6.34: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el segundo muestreo (julio de 2002)

PC Nº	Metal ligado a SBPM (Acumulativa)	Metal ligado a SBPM (Explicada)
1	58,58	58,58
2	81,93	22,95
3	93,14	11,21
4	97,89	4,75
5	100,00	2,11

Se puede ver que con dos componentes principales se explica un porcentaje adecuado de la variabilidad existente entre los datos en ambos muestreos. Así, en la **tabla 6.35** se puede ver el peso de cada metal en cada uno de los dos componentes.

Tabla 6.35: *Loadings* de las variables en los dos componentes principales

Variable	Muestreo febrero de 2002		Muestreo julio de 2002	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
% Cr	0,523	-0,109	0,412	-0,392
% Cd	0,124	0,132	0,328	0,760
% Pb	0,424	-0,440	0,535	0,330
% Cu	0,653	-0,087	0,528	-0,325
% Zn	0,324	0,877	0,396	-0,233

En el muestreo de febrero de 2002, el porcentaje de Cu y Cr ligados a SBPM tienen más peso sobre el PC 1 (0,653 y 0,523), mientras el porcentaje de Zn asociado a SBPM lo tiene sobre el PC 2 (0,877). Los porcentajes de Pb y el Cd presentan pesos similares sobre ambos componentes principales (0,424 y 0,124 en PC 1, -0,440 y 0,132 en PC 2). Por lo tanto el PC 1 vendrá explicado por las variables porcentajes de Cu, Cr y Pb asociado a SBPM y el PC 2 por las variables porcentajes de Zn y Pb asociado a SBPM. Aquí los valores de los residuales han sido despreciables para todos los puntos excepto para el 11, de este modo el análisis de PCA se llevó a cabo con todos los puntos menos éste. En el segundo muestreo los porcentajes de Pb, Cu y Zn presentan más peso sobre el PC1 (0,535, 0,528, 0,396), el porcentaje de Cd sobre el PC2 (0,760) mientras que el porcentaje de Cr presenta pesos importantes en ambas PCs (PC1=0,412 y PC2=(-392)).

En las **figuras 6.16** y **6.17** se puede ver la semejanza entre las muestras para los dos muestreos cuando se emplea el porcentaje de metal asociado a SBPM como variables discriminantes. Para el muestreo de febrero de 2002 (**figura 6.16**), se observa que las muestras 12, 16 y 29 no se relacionan ni entre sí ni con otras. Son muestras localizadas en el margen derecho-central de la ría. Otro grupo es el formado por las muestras 9, 13, 20, 23, 24 y 30 situadas en su mayoría alrededor de la Illa, y el último grupo está formado por las muestras 14, 15, 17, 18, 19 y 22, situadas en la desembocadura del río Ulla y margen izquierdo de la ría.

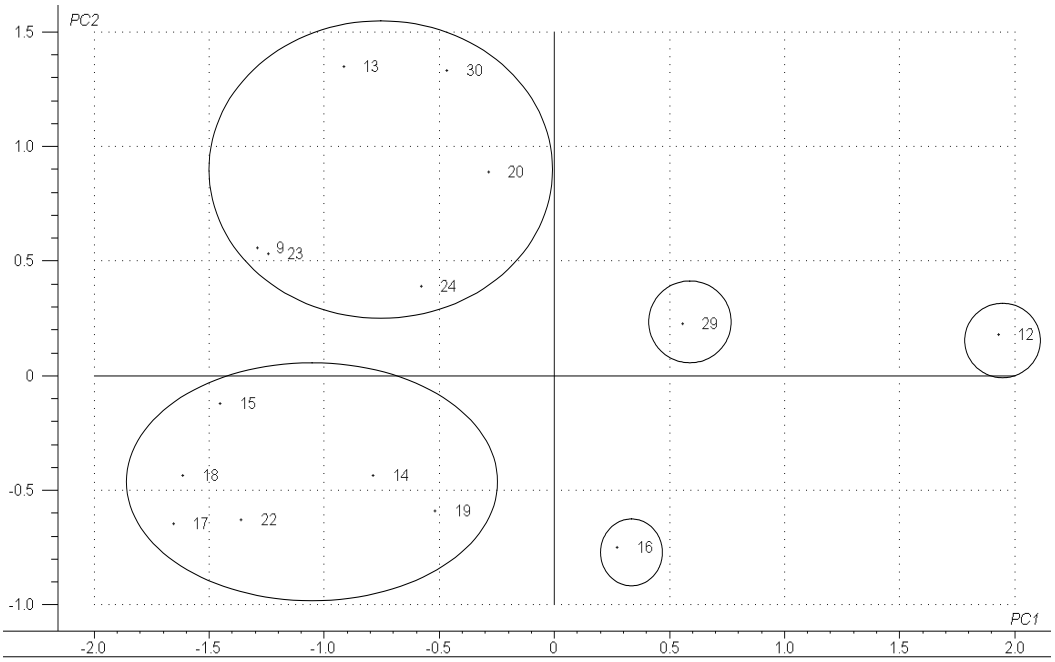


Figura 6.16: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (febrero 2002)

Para el segundo muestreo, **figura 6.17**, las muestras 20 y la 29 no pertenecen a ningún grupo. A continuación, podemos ver dos grupos, el formado por 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18 y 24, muestras situadas al margen derecho de la ría y en la desembocadura del río Ulla, menos el 24 que pertenece a la península de O Grove; y otro constituido por los puntos 14, 17, 19, 22, 23 y 30, puntos localizados alrededor de la Illa de Arousa, al margen izquierdo y desembocadura del río Ulla.

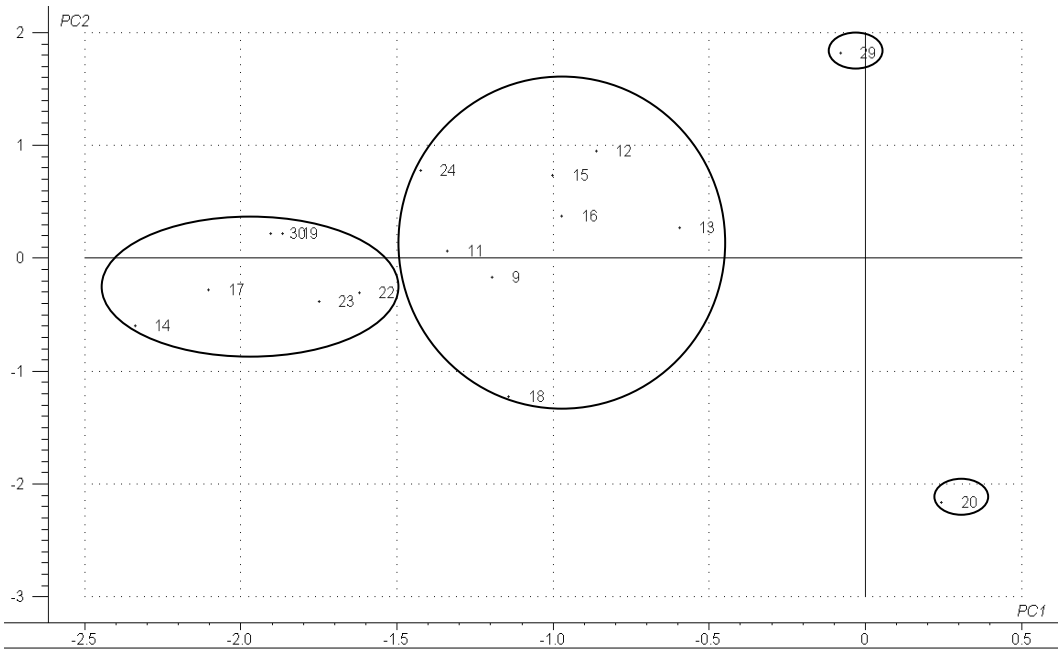


Figura 6.17: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs (julio 2002)

Como puede verse en las **figuras 6.12** a **6.17**, los agrupamientos entre las distintas muestras cambian en función del contenido total del metal o bien del contenido de metal asociado a las SBPM. Igualmente la distribución es distinta cuando se usa como variable discriminante el porcentaje de metal unido a las SBPM respecto al contenido total de metal en la muestra húmeda.

Cuando se emplea como variable clasificatoria, el porcentaje de metal ligado a las SBPM con respecto al metal total en el mejillón húmedo, observamos para el primer muestreo unas agrupaciones claras y definidas, las cuales están en función de la magnitud del porcentaje. Así se observa que las muestras situadas en el margen derecho de la ría presentan mayor porcentaje de metal ligado a las SBPM que aquellas muestras situadas en la desembocadura del Ulla y en el margen izquierdo de la ría. Sin embargo, para las muestras del segundo muestreo no ocurre esto, las agrupaciones son muy heterogéneas habiendo agrupaciones formadas por muestras que geográficamente están localizadas muy alejadas entre sí. Para este muestreo, en cuanto al porcentaje de metal ligado, la primera agrupación (9, 11, 12, 13, 15, 16, 18 y 24) para todos los metales excepto para el Cd, presentan mayores porcentajes y la segunda (14, 17, 19, 22, 23 y 30) menores. Además, en general dicho porcentaje disminuye de un muestreo a otro, como ocurría en las dos variables clasificatorias anteriores.

Estos resultados se corresponden con aquellos relativos a la concentración de metal ligado a las SBPM, siendo importante el efecto de las corrientes marinas en los procesos de bioacumulación del metal. Sin embargo, el porcentaje nos explica mejor la distribución de las muestras que el propio contenido de metal ligado a las SBPM. Esto es así debido a que el mejillón puede estar expuesto a una concentración pequeña o grande de un metal durante un período de tiempo mayor o menor. El efecto de dicha contaminación va a ser distinto según el tiempo de contacto y la concentración del contaminante. Por tanto, un mejillón que está expuesto a dosis pequeñas de metal pero durante un tiempo elevado puede tener el mismo porcentaje de metal ligado a SBPM que un mejillón expuesto a una concentración elevada durante un tiempo menor. Por tanto, el porcentaje de metal ligado a SBPM es un indicador más adecuado de contaminación crónica (estrés metálico para el mejillón), quedando esta situación perfectamente reflejada en las gráficas de las **figuras 6.16** y **6.17**.

2.7.2- ANÁLISIS DE CLUSTER

Con el objeto de complementar la clasificación de las muestras de mejillón en cada uno de los muestreos, se ha llevado a cabo un análisis de cluster. Los resultados, en forma de dendrogramas, para cada campaña se representan en las **figuras 6.18** a **6.23**.

2.7.2.1- NIVELES TOTALES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn (concentración en peso seco)

El dendograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002 es el que se puede observar en la **figura 6.18**. Si cortamos a una distancia de 40, se ven tres grupos; así y empezando por la derecha, tenemos el grupo formado por las muestras 15 y 16 muestras localizadas en la desembocadura del río Ulla, otro donde nos encontramos con las muestras 19, 20, 22, 23 y 24, muestras localizadas alrededor de la Illa y en la península de O Grove. En el último cluster tenemos a las muestras 11, 12, 13, 14, 17, 18, 29 y 30, muestras localizadas principalmente en el margen derecho de la ría, lo que indica que éstas presentan entre sí similitud. Estas agrupaciones coinciden bastante bien con las encontradas en el análisis de PC.

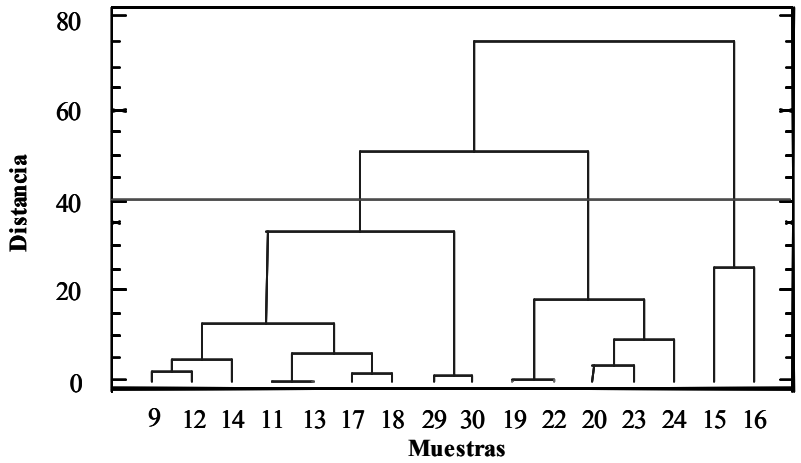


Figura 6.18: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002

Para el muestreo de julio de 2002, **figura 6.19**, tenemos las agrupaciones siguientes: la agrupación formada por las muestras 14, 16 y 29, muestras correspondientes a la desembocadura del río Ulla y al margen derecho de la ría. La segunda agrupación la forman las muestras 11, 12, 13, 17, 18 y 20, situadas tanto al margen derecho como al izquierdo de la ría. Otro grupo lo forman los puntos 19, 24 y 30, situados en la Illa de Arousa y en O Grove. En un último grupo podemos ver a las muestras 9, 15, 22 y 23. Si comparamos estos resultados con los obtenidos mediante el análisis de PC se puede decir que son iguales a excepción de que con el análisis de cluster se obtiene un grupo más, lo cual hace que se clasifiquen las muestras de una forma más exhaustiva.

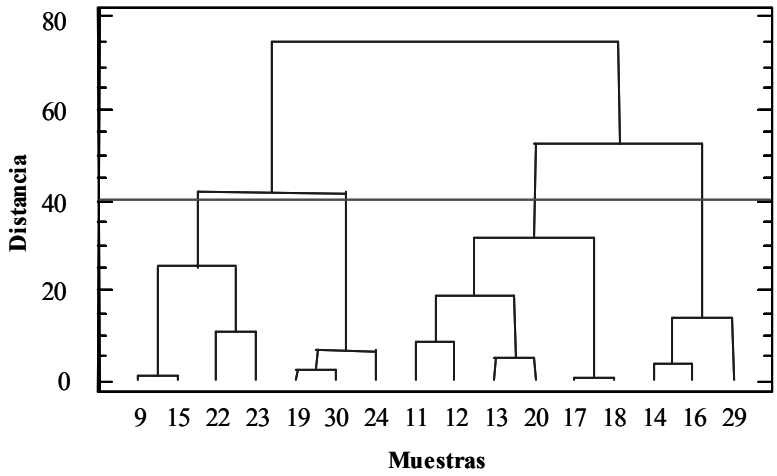


Figura 6.19: Dendrograma correspondiente al muestreo de julio de 2002

2.7.2.2- NIVELES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn LIGADO A LAS SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR

En la **figura 6.20** se muestra el dendograma que hace relación a la concentración de metal unido a las SBPM del muestreo de febrero de 2002. Se puede ver (siempre a una distancia de 40) tres clusters, en el primero formado por las muestras 12 y 16 (margen derecho-central de la ría), esto también se veía en el caso del análisis con PC. En el segundo grupo tenemos las muestras 15, 17, 18 y 22 (muestras del margen izquierdo-central de la ría), y en el tercero las muestras 9, 11, 13, 14, 19, 20, 23, 24, 29 y 30, todas del margen derecho-central de la ría menos la 24 y la 30 que son del margen izquierdo.

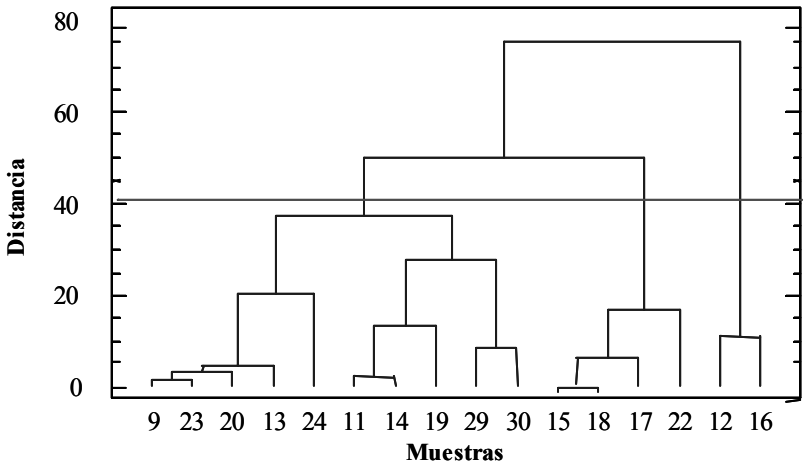


Figura 6.20: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002

En el muestreo de julio de 2002, **figura 6.21**, existe un grupo formado por las muestras 14, 15, 17, 18, 19 y 22, situadas en la desembocadura del río Ulla, alrededores de la Illa de Arousa y en el margen izquierdo de la ría. Otro grupo es el formado por las muestras 11, 13, 16, 20, 24 y 29, localizadas en el margen derecho-central de la ría menos el punto 24 que está en península de O Grove. Y un último grupo constituido por los puntos 9, 12, 23 y 30, localizados alrededor de la Illa de Arousa menos el 12 que se encuentra en el margen derecho de la ría. Estas agrupaciones se corresponden bastante bien con las obtenidas a través del análisis de componentes principales, PCA.

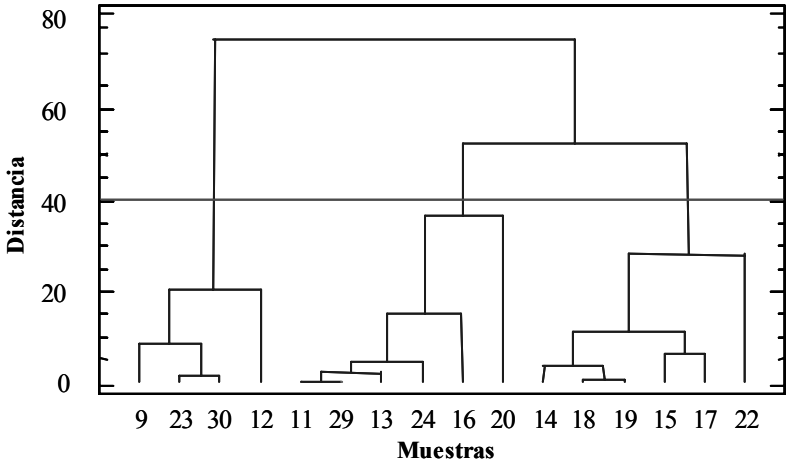


Figura 6.21: Dendrograma correspondiente al muestreo de julio de 2002

2.7.2.3- PORCENTAJES DE Cr, Cd, Pb, Cu Y Zn LIGADO A LAS SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR

En la **figura 6.22** podemos ver el dendrograma para el porcentaje de metal unido a las SBPM en el primer muestreo. Si cortamos a una distancia de 40, se observan tres grupos, a saber uno formado por las muestras 12, 16 y 29 (margen derecho-central de la ría), agrupación que ya se observaba para el PCA y que no presentaban similitud entre sí. Otro cluster formado por las muestras 11, 14, 15, 17, 18 y 22, muestras tanto del margen derecho como del izquierdo, este grupo aparece también en PCA con la muestra 19. El último grupo está formado por las muestras 13, 19, 20, 23, 24 y 30, muestras del margen derecho y del izquierdo.

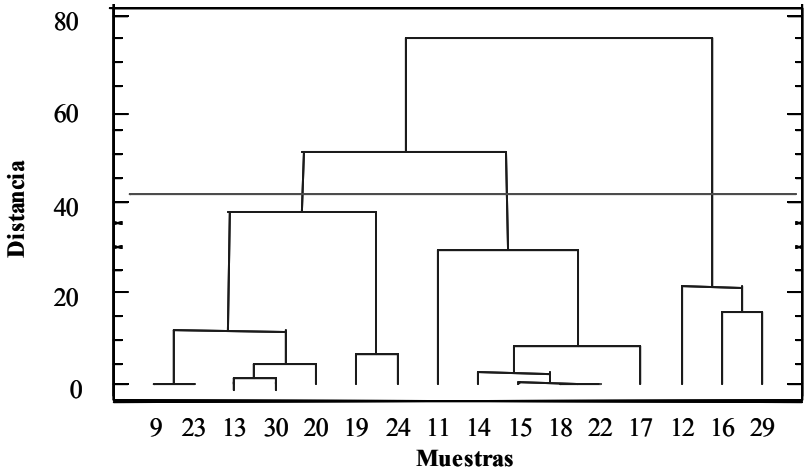


Figura 6.22: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002

En el segundo muestreo, **figura 6.23**, se ve que tanto la muestra 20 como la 29 (muestras situadas hacia la desembocadura de la ría) no pertenecen a ningún grupo (no presentan similitud con ningún grupo). Esto también se veía en el análisis con PC. Después hay dos grandes grupos, por un lado el formado por 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 22 y 24, y por otro por 9, 12, 18, 23 y 30. Las del primer grupo están situadas, en su mayoría, en el margen izquierdo-central de la ría. En este caso las clasificaciones no se parecen mucho a las obtenidas mediante PCA.

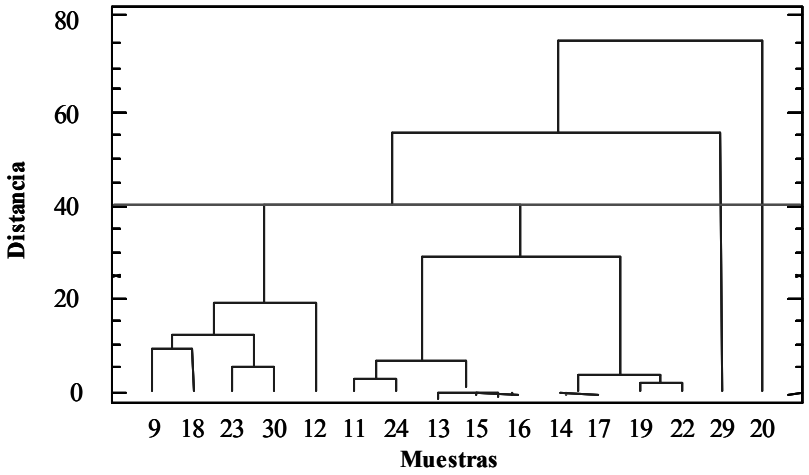


Figura 6.23: Dendrograma correspondiente al muestreo de julio de 2002

*2.8- ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE LA FRACCIÓN DE METALES LIGADOS A LA ISOFORMA **MLP-I***

Las muestras de mejillón de batea correspondientes al muestreo de febrero de 2002 se sometieron al procedimiento de preparación del extracto citosólico por percusión y al procedimiento de preparación del extracto citosólico asistido por PLE descritos en el Capítulo IV. Las fracciones de metales ligados a la isoforma MLP-I se determinaron siguiendo el método de determinación por HPLC-ICP-OES *off line* descrito en el Capítulo IV (**tabla 4.10** y **4.11**). Como se expuso en el último apartado del Capítulo IV, el empleo de PLE para asistir el proceso de preparación del extracto citosólico ofrece contaminación por Ba. Por este motivo, el estudio quimiométrico se llevará a cabo con los resultados de concentración de metales asociados a la isoforma MLP-I en extractos citosólicos preparados por percusión (**tabla 4.22**, Capítulo IV).

2.8.1- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Tras el proceso de pretratamiento de los datos basado en la transformación valor central–rango medio **[4]**, las variables concentración de Ba, Cu, Mn, Sr y Zn asociados a MLP-I se emplearon como variables de discriminación.

En la **tabla 6.36** se listan los porcentajes de variabilidad explicada y acumulada para los cinco componentes principales. De los cinco componentes, los tres primeros presentan valores para el vector propio superiores a la unidad (1,696, 1,482 y 0,944 para el PC1, PC2 y PC3, respectivamente). Como puede verse, con los tres primeros componentes principales se explica un 82 % de la información contenida en la tabla de datos.

Tabla 6.36: Variabilidad explicada y acumulativa para cada PC en el primer muestreo (febrero de 2002)

PC Nº	Metal ligado a MLP-I (Acumulativa)	Metal ligado a MLP-I (Explicada)
1	33,91	33,91
2	63,55	29,63
3	82,44	18,89
4	93,53	11,09
5	100,00	6,47

Por su parte, en la **tabla 6.37** se muestran los pesos de cada una de las variables utilizadas en el modelo PCA sobre cada uno de los componentes principales. Como puede verse, el componente principal 1 está explicado casi exclusivamente por la variable Sr-MLP-I, mientras que los componentes principales 2 y 3 los están por las variables Mn-MLP-I y Zn-MLP-I, respectivamente.

Tabla 6.37: *Loadings* de las variables en los dos componentes principales

Variable	PC 1	PC 2	PC 3	PC4	PC5
Ba-MLP-I	-0,142	0,308	-0,024	-0,120	0,932
Cu-MLP-I	0,221	0,039	0,060	0,967	-0,106
Mn-MLP-I	0,082	0,947	0,094	0,046	0,293
Sr-MLP-I	0,963	0,074	0,016	0,224	-0,126
Zn-MLP-I	0,010	0,080	0,995	0,055	-0,018

Por otra parte, la gráfica de *scores* definida por los dos primeros componentes principales se muestra en la **figura 6.24.** Puede verse que las muestras se agrupan de manera natural en dos grupos; un primer grupo situado en la parte inferior del gráfico (coordenadas para el PC2 inferiores a la unidad) y un segundo grupo en la parte superior (coordenadas positivas sobre el PC2). Las

muestras de mejillón de batea pertenecientes al primer grupo son 9, 13, 14, 15, 18, 19, 22 y 29, muestras localizadas en el interior y en el margen derecho-interior de la ría, salvos las muestras 18, 19 y 22 (pertenecientes al eje central de la ría). El segundo grupo está formado por las muestras 11, 16, 23 y 30, muestras en su mayoría del margen central-izquierdo de la ría, salvo la muestra codificada como 11. Las muestras 12 y 20 parecen ser independientes.

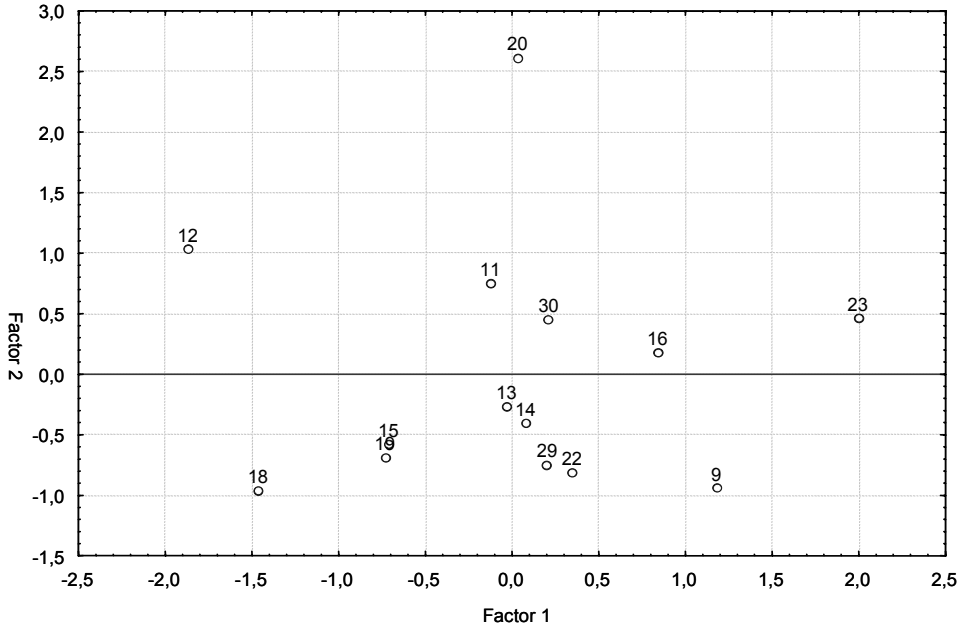


Figura 6.24: Gráfico de *scores* para muestras de mejillón de batea en el espacio bidimensional formado por los dos primeros PCs

2.8.2- ANÁLISIS DE CLUSTER

Se llevó a cabo un análisis de cluster empleando el método de ward como método aglomerativo y la distancia Euclídea como medida de la similaridad. Los resultados, en forma de dendrogramas se representan en la **figura 6.25**. Empezando por la izquierda y para una distancia de 2,0 nos encontramos con seis clusters. El primero formado por las muestras 12 y 29 (margen derecho de la ría); el segundo, por las muestras 11 y 14 (margen derecho de la ría); el tercero, por las muestras 18 y 19 (margen izquierdo-central de la ría); el cuarto, por las muestras 13, 15, 22 y 30 (margen izquierdo de la ría (30), derecho (13), central (22) y desembocadura del río Ulla (15)); el quinto formado por la muestra 20; y el sexto, por las muestras 9, 16 y 23 (margen derecho de la ría). Cabe destacar que esta clasificación se asemeja bastante a la ofrecida por PCA.

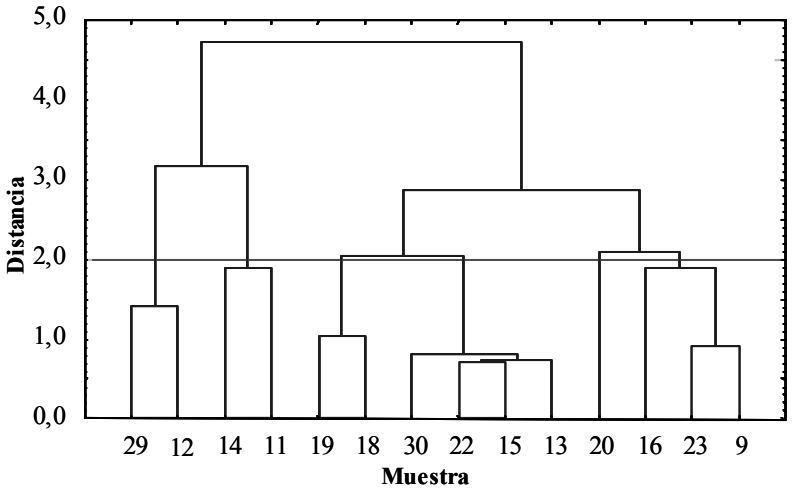


Figura 6.25: Dendrograma correspondiente al muestreo de febrero de 2002

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el presente capítulo podemos concluir que el empleo de las fracciones de metales ligados a SBPM, o bien a la isoforma MLP-I, ofrece una clasificación de las muestras de mejillón de batea de la Ría de Arousa en función de las características hidrodinámicas de la misma. Así, las muestras de mejillón cultivadas cerca de la desembocadura del río Ulla (muestras 14, 15 y 16) y aquellas cultivadas en el margen derecho de la ría (muestras 11, 12, 13 y 29) presentan gran similitud en función de la biosíntesis de biomarcadores tales como las MLPs. Esto es coherente con las corrientes marinas en la Ría de Arousa, las cuales consisten en una corriente subterránea que entra desde mar abierto por el margen izquierdo de la ría y sale superficialmente por el margen derecho de la misma. Además, como ya se ha comentado, el caudal de la corriente de salida es menor que el caudal de la corriente de entrada, obteniendo un estancamiento parcial de las aguas en el margen derecho del estuario. Todo esto explica que las muestras de mejillón cultivadas en la desembocadura del río Ulla (parte más interna de la ría) sean similares a aquellas cultivadas en el margen derecho. Los lixiviados arrastrados así por el río Ulla extienden así su efecto al margen derecho de la Ría de Arousa, haciendo además que los mejillones cultivados en esta zona sufran un mayor estrés por contaminación de metales (las principales fuentes de contaminación metálica en la Ría de Arousa proceden de los lixiviados transportados por el río Ulla).

El empleo de los contenidos totales de metales como variables discriminatorias, sin embargo, no ofrece una clasificación clara de las muestras de mejillón de batea cultivadas en la Ría de Arousa. Esto puede deberse a los distintos vertidos que las numerosas poblaciones situadas a ambos márgenes de la ría vierten sobre ésta. Ello explica también el hecho de las mayores concentraciones de algunos metales en las muestras recogidas en los muestreos de verano (julio de 2002 y 2003) asociados a una mayor actividad en los puertos de recreo de la zona.

Por último decir que para los metales sometidos a estudio cuya concentración máxima en moluscos se encuentra legislada, Cd, Cu y Zn (ver apartado de legislación en Introducción General), se comprueba que, refiriéndonos a concentración en peso fresco ya que la reglamentación así lo expresa, ésta es en todos los casos inferior.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] X. L. Otero, P. VidalTorrado, R. M. Calvo de Anta, F. Macías, "*Trace elements in biodeposits and sediments from mussel culture in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain)*". Environmental Pollution, 2005, 136, 119-134.

[2] R. Beiras, J. Bellas, N. Fernández, J. I. Lorenzo, A. Cobelo García, "*Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (Mytilus galloprovincialis) versus embryo–larval bioassays using Paracentrotus lividus and Ciona intestinalis"*. Marine Environment Research, 2003, 56, 531-553.

[3] R. Prego, A. CobeloGarcía, *"Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula)"*. Environmental Pollution, 2003, 121, 425-452.

[4] A. Moreda Piñeiro, A. Marcos, A. Fisher, S. J. Hill, "*Evaluation of the effect of data pre-treatment procedures on classical pattern recognition and principal componentes analysis: a case study for the geographical classification of tea"*. Journal of Environmental Monitoring, 2001, 3, 352-360.

[5] R. Cela, *"Avances en Quimiometría práctica"*. 1994 Ed. Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, A Coruña, España.

[6] J. N. Miller, J. C. Miller, *"Estadística y Quimiometría para Química Analítica"*. 2002 Ed. Prentice Hall, Madrid, España.

[7] M. Meloun, J. Militlky, M. Forina, *"Chemometrics for Analytical Chemistry"*.1992 Ed. Ellis Horwood, Nueva York, Estados Unidos.

[8] G. Rosón, X. A. Álvarez-Salgado, F. F. Pérez, *"A non stationary box model to determine residual fluxed in partially mixed estuary based on thermohaline properties: application to the Ria de Arousa (NW Spain)"*. Estuarine and Shelf Science, 1997, 44, 249-262.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Se han optimizado los procedimientos de determinación de Cr, Cd, Pb por ETAAS y Cu y Zn por FAAS, total y ligados a las sustancias de bajo peso molecular (SBPM). Para los metales determinados por ETAAS (Cr, Cd y Pb) los programas óptimos en horno de grafito son rápidos y sencillos. Además, la cantidad de surfactante (Triton X-100) y la de modificador químico ($Mg(NO_3)_2$ y $Pd(NO_3)_2$) empleados no son elevadas. Cabe destacar que no es necesario emplear surfactante ni modificador para la determinación de Cr ligado a las sustancias de bajo peso molecular. Por otro lado, los métodos son sensibles, precisos y exactos. También se ha optimizado un método de determinación de metales en mejillones por ICP-OES, destacando la existencia de efecto matriz. Además, se ha estudiado el uso de los STATs en la determinación del Cd en mejillones por STAT-FAAS. Los tubos que mejores resultados ofrecen en cuanto a sensibilidad son los que presentan entre la ranura de entrada y la de salida un ángulo de 120º, no siendo determinante ni la longitud total del tubo ni la de la ranura de salida.

La existencia de dos isoformas de MLP hizo necesaria la especiación de éstas mediante HPLC de intercambio iónico. Para ello se optimizó la concentración de fase móvil Tris-HCl y el flujo de ésta en el sistema cromatográfico. Los resultados óptimos fueron de 75 mM y 0,8 ml/min, obteniéndose en estas condiciones una buena separación de las dos isoformas en 10 minutos con una resolución de 1. Se estudió también el acoplamiento tanto de forma *on line* como *off line* entre el sistema de separación cromatográfico HPLC y el de detección metálica multielemental ICP-OES, para elucidar tanto la distribución (*on line*) como la concentración metálica (*off line*) de Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr y Zn presentes en cada isoforma. En general el acoplamiento ofrece buenos resultados para los elementos antes mencionados. Para otros, como el Cd, es necesario el uso de otras técnicas de detección más potentes como la Espectrometría de Masas.

Se han optimizado dos métodos para la preparación del extracto citosólico de mejillón; uno basado en la utilización del mecanismo de percusión (Stomacher), y otro en la extracción con líquidos presurizados (PLE). Ambos métodos son sensibles, precisos y comparables en cuanto a la determinación de Cu, Mn, Sr y Zn.

Debido a las bajas concentraciones de metal presentes en las distintas isoformas de MLP, se procedió a investigar diferentes métodos de preconcentración como la preconcentración en fase sólida (SPE) con resinas de C_{18}, la preconcentración con tubos de filtración por centrifugación

exclusivos para la preconcentración de proteínas y la preconcentración mediante liofilización del extracto citosólico de mejillón. Con el primer método se logra preconcentrar la parte proteica pero no el metal ligado a ésta. Esto es debido a la pérdida del metal al romperse el enlace entre éste y la MLP. Con el segundo proceso de preconcentración, aunque los tubos utilizados poseen un filtro adecuado al tamaño de nuestras proteínas, la preconcentración no se logra fundamentalmente por la linealidad que éstas presentan provocando que no que queden retenidas en dicho filtro. El último procedimiento, el de liofilización del extracto citosólico de mejillón, es el único válido, detectándose tras la aplicación de éste metales como el Pb o el Cd, que eran imposibles de detectar en el extracto sin preconcentrar. Además ofrece unos buenos LODs y LOQs para los metales determinados.

En cuanto al estudio quimiométrico de los resultados obtenidos al aplicar los diferentes métodos optimizados, cabe decir que las muestras de mejillón de batea procedentes de la Ría de Arousa ofrecen una clasificación en función de las características hidrodinámicas del estuario. Esto es así, si se emplea como variable clasificatoria la concentración metálica asociada a las SBPM o a la fracción de MLP-I. Así, existe una relación clara entre las muestras localizadas en la desembocadura del Río Ulla y al margen derecho de la Ría, debido a que sufren mayor estrés metálico como consecuencia de las corrientes marinas que tienen lugar, las cuales hacen que los contaminantes en general y aquellos arrastrados por el río permanezcan más tiempo en estas zonas. Por otro lado, no se encuentra una clasificación clara de las muestras de mejillón de batea cuando se intenta realizar la clasificación utilizando como variable discriminatoria el contenido total de metal. Se observa, sin embargo, que las muestras que presentan mayores concentraciones son las situadas en puertos pesqueros de actividad importante.

ANEXO

Blending Procedure for the Cytosolic Preparation of Mussel Samples for AAS Determination of Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn Bound to Low Molecular Weight Compounds

Rebeca Santamaría-Fernández[b], Sandra Santiago-Rivas[a], Antonio Moreda-Piñeiro[a], Adela Bermejo-Barrera[a], *Pilar Bermejo-Barrera[a], and Steve. J. Hill[b]

[a] Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias s/n, 15782 - Santiago de Compostela, Spain

[b] Department of Environmental Sciences, Plymouth Environmental Research Centre, University of Plymouth, Drake Circus, PL4 8AA Plymouth, Devon, U.K.

ABSTRACT

Simple methods for the determination of Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn fractions bound to low molecular weight compounds (presumably metallothionein-like proteins) in mussels (Mytilus edulis) have been developed. The methods involve the novel application of using a blending (Stomacher) rather than a cutting mixer device to perform the homogenization between the fresh mussel tissue and the extractant solution [10 mM TRIS–HCl buffer at pH 7.4 with 5 mM 2–mercaptoethanol (2–MCE), 0.01 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 25 mM sodium chloride]. Optimum conditions for the cytosolic preparation (after an experimental design approach) were a ratio of sample weight : extracting volume of 0.2 g/mL and a blending time of 5 min. The Cu and Zn concentrations bound to low molecular weight compounds (LMW proteins) were measured by flame atomic absorption spectrometry using a high performance nebulizer, while Cd, Cr, and Pb levels in the cytosolic solutions were assessed by electrothermal atomic absorption spectrometry. A microwave-assisted acid digestion procedure was also applied to determine the total metal concentration. The limits of detection (LOD) for Cd, Cr, and Pb were 0.7, 3.0, and 6.6 ng g^{-1}, respectively, and for Cu and Zn they were 0.05 and 0.01 µg g^{-1}, respectively. The methods were applied to 16 mussel samples from the Ría de Arousa estuary.

INTRODUCTION

Metallothionein-like proteins (MT-like proteins) are low molecular weight proteins that have a high cystein content (around ±30% of the residues) and a strong affinity for heavy metals (1). These proteins play an important role in the metabolism and kinetics of Cd and Cu, and regulate the toxicity of various metals and trace elements. Metallothioneins (MTs) and MT-like proteins have been described for various foodstuffs, mainly fish and mollusks (1). It appears that in fish, MTs should be considered as a kind of stress protein that is particularly responsive to heavy metals. In mollusks, MTs seem more involved in responses to heavy metals and they can be considered as biomarkers of exposure to heavy metal contamination (2).

From the studies performed on MTs in mollusks and the results available in the literature (3), it can be said that several physiological and biochemical parameters might affect the concentration and isolation of MTs from mollusk tissue. Significant variations in isolation and quantification of MTs might depend on the purification and storage protocol and, as described by Isani et al. (4), the development of a standard protocol for MT isolation and quantification is still an important goal to be achieved. Although there is no standard method, it is well known that denaturation of the samples at low temperatures, instead of the solvent precipitation process, allows the isolation of MTs from other high molecular weight proteins without MT alteration (5,6). However, some works have reported important changes on metal distribution in MT-like protein isoforms due to heating treatments (7). Regarding the cytosol isolation process, Wolf et al. (8) have compared several homogenization procedures (cutting mixers, rotating pestles, and sonication devices) in terms of functionality. These authors concluded that sonication in comparison to pestles and cutting devices [Ultra–Turrax (9,10)] offers the best performance because there is no risk of contamination or formation of foam.

As recently reported by Prange and Schaumlöffel (3), several speciation studies have been performed to determine trace elements in MTs from rabbit (11,12), rat (13), and human (7) livers, as well as from mollusks (9,10,13,14,15). Hyphenated techniques with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP–MS) as a multi-element detector are used throughout these studies. Therefore, different modalities of high performance chromatography (HPLC), such as size exclusion chromatography (SEC) and capillary electrophoresis (3) were used to isolate different MTs and even different MT isoforms. These hyphenated techniques are, most of the time, expensive and not available in many laboratories.

*Corresponding author.
e-mail: pbermefo@usc.es

Therefore, the aim of this work was to develop simple atomic absorption spectrometric methods to determine the fraction of metals (Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn) bound to MT-like proteins in mussels (*Mytilus Edulis*). Since a prior chromatographic stage is omitted, the term low molecular weight (LMW) compounds will be used rather than MT-like proteins. Additionally, a novel procedure for the homogenization of the mussel samples has been optimized by the use of a blending system (Stomacher) where the samples are contained within sterile metal-free disposable bags, thus eliminating instrument contamination, and achieving homogenization by blending.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

A PerkinElmer Model 1100B atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), equipped with an HGA®-400 graphite furnace and an AS-40 autosampler. Deuterium lamp background correction was used for Cd, Cr, and Pb measurements. A PerkinElmer Model 3100 atomic absorption/emission spectrometer with a high-performance nebulizer equipped with ceramic impact beads (PerkinElmer) was used for the Cu and Zn determinations. Background correction was found unnecessary for FAAS determinations.

Cd and Zn (PerkinElmer) and Cr and Cu (Cathadeon, Cambridge, U.K.) hollow cathode lamps, and a Pb electrodeless discharge lamp (PerkinElmer) connected to a power supply (PerkinElmer) were used as the radiation sources. The lamps were operated at the lamp currents/lamp voltages and with slit widths and wavelengths as recommended by the manufacturer. A Stomacher Lab Blender 400 (Seward Med. Ltd., London, UK) was used to blend and homogenize the fresh mussel samples using Stomacher sample bags (Part No. 6041/CLR). Centrifuge Centromix (Selecta, Barcelona, Spain), refrigerated centrifuge Laborzentrifugen 2K15 (SIGMA, Osterode, Germany), and ORION 720A plus pH meter with a glass calomel electrode (ORION, Cambridge, UK) were also used. A Samsung domestic microwave oven (Seoul, Korea), programmable for time and microwave power, was used for total sample digestion. The poly(tetra-fluoroethylene) (PTFE) bombs were laboratory-made with hermetic seals (suitable for work at low pressures). The chemometrics packages used were UNSCRAMBLER, 1998 (CAMO ASA, Trondheim, Norway) and Statgraphics Plus V 5.0 for Windows® OS, 1994-1999 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Reagents and Standards

The chemicals were of ultrapure grade, using ultrapure water, resistance 18 MΩ cm (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Stock standard solutions (1000 g L^{-1}) were obtained from Merck, Poole, Dorset, UK. Palladium nitrate stock standard solution, 10,000 g L^{-1} (from PerkinElmer). Magnesium nitrate stock standard solution was prepared from magnesium nitrate (from BDH, Poole, Dorset, UK). Hydrogen peroxide 33% (from Panreac, Barcelona, Spain). Nitric acid 70.0% and hydrochloric acid 37% (from J.T. Baker B.V., Deventer, Holland). The extracting solution was prepared with TRIS-hydroxymethyl-aminomethane (Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Stemheim, Switzerland), 2-mercaptoethanol (2-MCE) (Fluka, Sigma-Aldrich), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Fluka, Sigma-Aldrich), and sodium chloride (Merck, Darmstadt, Germany).

Mussel Samples

Fresh mussel samples were collected from mussel farms at Ría de Arousa estuary (Galicia, Northwest Spain). The mussels were analyzed as wet samples for total metal and fractions bound to low molecular weight compounds. All studies were performed using all mussel tissue (muscle and gill) by preparing a mussel pool mixture with all the mussels from each mussel farm.

Methods

Procedure for Cytosol Preparation

Cytosolic extracts were obtained based on a modified protocol of the methods reported by Roesijadi and Fowler (10) and Lobinski et al. (14). The extracting solution was prepared with TRIS-HCl at 10 mM (pH 7.4), 0.01 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM 2-mercaptoethanol (2-MEC), and 25 mM NaCl. The homogenization and blending procedure was as follows: fresh mussel samples were accurately weighed (~5 g) into the Stomacher bag and 25 mL of extracting solution was added. The mixture was subjected to blending at high speed for 5 min, and was then transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 3500 rpm for 30 min. The solid precipitated was separated by decantation and the liquid extract was transferred into a second centrifuge tube and warmed in a water bath at 60°C for 15 min. Posterior centrifugation at 4°C and at 19,890 g (15,300 rpm) for 30 min was carried out to separate the tertiary structure proteins which suffered denaturization at high temperature. Cytosols, obtained by decantation, were diluted to 25 mL with ultrapure water.

Microwave Acid Digestion

Acid digestion was carried out in a domestic microwave oven with laboratory-made low pressure PTFE bombs. The optimum conditions for the digestion of wet mussel

samples were based on a modified method for dry mussels (16), and it can be summarized as follows: Approximately 0.7 g of fresh mussel sample was weighed into the PTFE bombs and 2 mL of concentrated HNO_3 was added. The samples were subjected to two microwave heatings (100 W) for 2 min with a cooling stage (ice-bath for 10 min) in between. The low microwave power was required to avoid losses because low pressure PTFE bombs were used. Then, 1 mL of 33% (m/v) H_2O_2 was added and the samples were again subjected twice to microwave irradiation at 200 W for 2 min, also inserting a cooling stage. Finally, the acid digests were made up to 10 mL with ultrapure water and stored in polyethylene bottles at 4°C. This methodology was validated after analyzing different certified reference materials (DORM-1, DOLT-1 and TORT-1) as reported in References 16–18.

ETAAS and FAAS Measurements

Cu and Zn were determined by FAAS (oxidizing air/acetylene flame) while Cd, Cr, and Pb determinations were carried out by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) under optimum conditions (see Table I). Chemical modification was necessary for Cd and Pb determinations and magnesium nitrate / palladium nitrate of 0.6/0.6 µg and 0.9/2.2 µg were found to be optimum for Cd and Pb, respectively. These chemical reagents were previously mixed with the samples and standard solutions before ETAAS measurements. Aqueous calibration was possible only for Cr determination by ETAAS. The use of the standard addition technique was required for Cu and Zn measurements by FAAS and for Cd and Pb determination by ETAAS.

TABLE I
Operating Conditions and Graphite Furnace Temperature Programs[a] for the ETAAS Determination of Cd, Cr, and Pb Bound to LMW Proteins

	Cd	Cr	Pb
Wavelength (nm)	228.8	357.9	283.3
Slit width (nm)	0.7	0.7	0.7
Lamp current (mA)	5	12	10[b]
Injection volume (µL)	20	20	20

	Step	Temp. (°C)	Ramp (s)	Hold (s)	Ar Flow Rrate (mL min^{-1})
Cd[c]	Drying	150	20	20	300
	Pyrolysis	500	15	25	300
	Atomization	1600	0	4	0 (Read)
	Cleaning	2200	1	3	300
Cr	Drying	150	20	20	300
	Pyrolysis	1400	10	15	300
	Atomization	2400	0	5	0 (Read)
	Cleaning	2650	1	2	300
Pb[c]	Drying	150	15	20	300
	Pyrolysis	800	20	10	300
	Atomization	1400	0	3	0 (Read)
	Cleaning	2200	2	3	300

[a] Pyrolytically coated graphite tubes with L'vov platforms, injection volume of 20 µL, integrated absorbance measurement.
[b] Power supply, 10 W.
[c] $Mg(NO_3)_2$ / $Pd(NO_3)_2$ as chemical modifier (0.6/0.6 µg for Cd and 0.9/2.2 µg for Pb).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the Cytosol Preparation

Optimization of the LMW protein extraction from mussel samples using the Stomacher blending device was carried out by using an experimental design approach. Variables such as pH and 2-mercaptoethanol (MEC) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) concentrations were not considered in the study. A pH of 7.4 was required to extract MT-like proteins and 2-MEC and PMSF were used only to prevent MT-like protein degradation. Therefore, the variables under study were blending (extracting) time (T) and the ratio of sample weight : extracting volume (w/v). Optimization of these two variables results in reduced time and sample weight required for the analysis. A central composite design, 2^2 + star, involving 18 experiments was used for optimization. Blending time ranged from 7.5 to 25 min and the ratio of sample weight : extracting volume varied from 0.5 to 2.0. The response variables were the metal concentrations (Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn) in each extract, determined by using an aqueous calibration or a standard addition graph and under optimum conditions. Details of the central composite design matrix (cube and star experiments) are given in Table II, as well as the response variables (concentrations of metal associated to MTs) for

TABLE II. 2^2 + Star Central Composite Design Matrix

Run	Time (min)	W/V (g mL^{-1})	Response Variables Cd (μg g^{-1})	Cr (μg g^{-1})	Cu (μg g^{-1})	Pb (μg g^{-1})	Zn (μg g^{-1})
1	3.88	1.25	0.029	0.031	0.171	0.009	1.69
2	3.88	1.25	0.023	0.029	0.173	0.010	2.27
3	28.62	1.25	0.031	0.027	0.143	0.010	5.64
4	28.62	1.25	0.033	0.029	0.117	0.009	2.87
5	16.25	0.19	0.057	0.035	0.348	0.047	3.99
6	16.25	0.19	0.069	0.035	0.348	0.044	2.86
7	16.25	2.31	0.015	0.015	0.086	0.007	1.27
8	16.25	2.31	0.014	0.022	0.085	0.009	0.83
9	7.50	0.50	0.035	0.031	0.289	0.023	6.25
10	7.50	0.50	0.037	0.034	0.258	0.018	2.96
11	25.00	0.50	0.031	0.028	0.200	0.007	2.66
12	25.00	0.50	0.030	0.034	0.200	0.008	3.24
13	7.50	2.00	0.024	0.028	0.114	0.004	2.39
14	7.50	2.00	0.017	0.019	0.086	0.006	1.55
15	25.00	2.00	0.030	0.018	0.087	0.006	2.00
16	25.00	2.00	0.032	0.017	0.087	0.006	1.85
17	16.25	1.25	0.031	0.020	0.115	0.006	2.83
18	16.25	1.25	0.036	0.018	0.116	0.006	2.15

TABLE III. Typical ANOVA Table for Cr Obtained by Response Surface Analysis

	Sum of Squares	Degree of Freedom	Main Squares	F-Ratio	p-Value
Summary					
Model	0.667	5	0.134	15.86	0.0001 [a]
Error	0.101	12	0.008		
Adjusted total	0.768	17	0.0452		
Variables					
Intercept	0.739	1	0.739	87.78	0.000 [a]
Time (A)	0.0203	1	0.0203	2.41	0.146
W/V (B)	0.522	1	0.522	61.98	0.000 [a]
AB	0.009	1	0.009	1.076	0.320
AA	0.114	1	0.114	13.51	0.003 [a]
BB	0.065	1	0.065	7.671	0.017 [a]
Model Check					
Main	0.542	2	0.271		
Interaction	0.009	1	0.009	1.076	0.302
Interaction + squares	0.116	2	0.058	6.908	0.010 [a]
Squares	0.116	2	0.058	6.098	0.010 [a]
Error	0.101	12	0.008		
Lack of Fit					
Lack of fit	0.0124	3	0.004	0.421	0.743
Pure error	0.089	9	0.010		
Total error	0.101	12	0.008		

Multiple correlation: 0.932 R-square: 0.869

[a] Statistically significant at a confidence level of 95.0%.

each experiment. It must be noted that after each experiment, the same procedure described before was performed (two centrifugation steps and a heating period in between).

After studying the ANOVA tables for each response variable (i.e., Table III for Cr), both variables (blending time and ratio of sample weight : extracting volume) were found to be independent and the effect of one does not produce variations in the other. In addition, it can be seen that the variable blending time is not statistically significant. Figure 1 shows the response surfaces achieved for each metal. It can be seen that blending time was found to be insignificant as long as it was kept between approximately 4 to 10 min for all elements; 5 min was chosen for further analysis. On the other hand, an optimum ratio of sample weight : extracting volume of 0.19 g mL^{-1} was found for Cd and Pb, and from 0.19 to 0.28 g mL^{-1} for Zn, and from 0.19 to 0.36 g mL^{-1} for Cu and Cr. In order to find compromise extracting conditions, a w/v ratio of 0.2 g mL^{-1} was chosen and was employed for further analysis. This w/v ratio means that 5 g of mussel sample and 25 mL of extracting solution was necessary. The optimum ratio obtained was quite different than previously reported by other authors (9,10,11,14), who used a ratio of 1 g mL^{-1} (10 g of mussel sample and 10 mL of extracting solution).

Comparison to Other Cytosol Preparations

The optimized blending procedure and the procedure described by Lobinski et al. (14), which uses a trituration device under recommended conditions, was applied three times to a mussel sample. Blank controls were performed for both cytosol preparation procedures and the Cd, Cu, Cr, and Zn concentrations were determined under optimum operating condi-

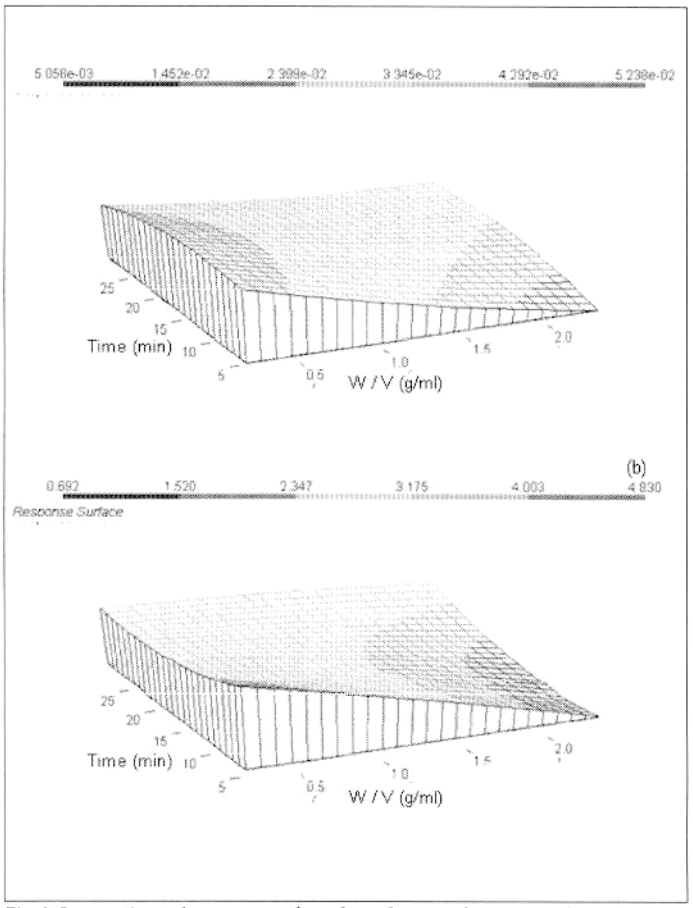


Fig. 1. Some esttimated response surfaces from the central composite design in the extraction of LMW-compounds from mussels: (a) cadmium and (b) zinc.

TABLE IV
Results of Cd, Cu, Cr, and Zn Determination After Stomacher Blending and OMNI Mixer Trituration Cytosol Preparation Procedures (μg g^{-1})

Element	Stomacher		OMNI Mixer	
	Mussel	Blank[a]	Mussel	Blank[a]
Cd (μg g^{-1})	0.02 ± 0.01	0.0030 ± 0.0001	0.02 ± 0.01	0.0040 ± 0.0001
Cu (μg g^{-1})	0.10 ± 0.01	0.0010 ± 0.0001	0.12 ± 0.01	0.0010 ± 0.0001
Cr (μg g^{-1})	0.03 ± 0.01	0.0050 ± 0.0002	0.16 ± 0.01	0.071 ± 0.016
Zn (μg g^{-1})	2.73 ± 0.28	0.0080 ± 0.0002	2.58 ± 0.17	0.0070 ± 0.0003

[a] Absorbance units.

tions. Table IV lists the mean and standard deviations obtained for each case. It can be seen that the concentration of metals bound to LMW compounds reached by both procedures is similar, although random Cr contamination was found when using the OMNI Mixer trituration device. This contamination was also found after determining high Cr levels in the blank solutions. After applying an ANOVA test (95% confidence level), it can be concluded that the efficiency of the Stomacher blending procedure for mussel cytosol preparation is comparable to the efficiency obtained using the OMNI Mixer trituration procedure, with the additional advantage of avoiding Cr contamination.

Analytical Performance

A statistical comparison between the slopes of the aqueous calibration and the standard addition graphs was made. Both calibration techniques were performed seven times on different days, and the results are listed in Table V. The differences between the slopes was studied by employing the ANOVA test to assess whether there are statistically significant differences for the standard deviation of each group (aqueous calibration and standard addition graphs) according to the Barlett and Cochran tests (19). The results show that the slopes of the aqueous calibration and standard addition graphs are statistically different for Cd and Pb determination by ETAAS, and for Cu and Zn measurement by FAAS. There were no statistically significant differences in the ETAAS determination of Cr. Therefore, matrix effects are important for Cd, Cu, Pb, and Zn determination, and the standard addition technique was used for further experiments. The aqueous calibration technique will be used for Cr.

The limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and

the characteristic mass (20) were established. LOD values of 0.7, 3.0, and 6.6 ng g^{-1} were obtained for Cd, Cr, and Pb, respectively, with characteristic masses of 1.1 ± 0.2, 5.7 ± 0.2, and 34.1 ± 1.6 pg, respectively. The LOD values for Cu and Zn were 0.05 and 0.01 μg g^{-1}, respectively.

The within-run precision for 11 injections of LMW compound extracts and expressed as %RSD was 1.7, 3.1, and 1.5 % for Cd, Cr, and Pb, respectively. The values obtained for Cu and Zn by FAAS with regard to 11 subsequent measurements was 0.2% for both cases. In addition, the repeatability of the overall procedure was assessed by preparing a cytosolic extract seven times from the same mussel sample and analyzing each sample twice. The RSD values of 6.1, 7.0, 9.1, 7.8, and 6.3% were obtained for Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn, respectively.

Application

Sixteen mussel samples from the Ría de Arousa estuary were analyzed for the elements Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn bound to LMW compounds. A mixture was made with mussel samples selected from each sampling location. Five g of each mixture was subjected (in duplicate) to the LMW compound extraction procedure, and each cytosolic extract was measured by ETAAS or FAAS. Additionally, mussel mixture from each sampling location were subjected (in duplicate) to a microwave acid digestion procedure to assess the total metal concentrations. Table VI shows the (%) metal concentration ranges for total metal concentration and metals bound to the LMW compound in the 16 mussels. It can be seen that Cd, Cu, and Zn are the metals with high percentages bound to LMW compounds, slightly above 10%. The maximum yield was up to 56% for Cu and Pb, while values of 46%, 39%, and 24% were reached for Zn, Cd, and Cr, respectively. It should be noted that the highest percentages of Cr, Cu, Pb, and Zn bound to LMW compounds were found in mussel samples from sampling location 12, (while the highest Cd percentages of 39% and 3% were for mussel samples from locations 24 and 12, respectively. Supplementary studies about metal concentrations in seawater and marine sediments from each of the sampling locations would be of interest in order to confirm possible metal stress in those areas.

TABLE V
Aqueous Calibration and Standard Addition Slopes
(Expressed as mean ± standard deviation for n = 7)

	Slopes (μg L^{-1})	
	Standard Addition	Aqueous Calibration
Cd	0.053 ± 0.011	0.039 ± 0.001
Cr	0.0190 ± 0.004	0.0201 ± 0.003
Cu[a]	0.151 ± 0.008	0.199 ± 0.002
Pb	0.0043 ± 0.0003	0.0020 ± 0.0003
Zn[a]	0.472 ± 0.026	0.805 ± 0.024

[a] (mg L^{-1}).

TABLE VI
Total Metal and Metal-Bound LMW Compounds
(Concentration ranges in mussel samples.)

	Mussels (16 Samples)		
	Total Concentration Range (μg g^{-1}) Wet Weight of Tissue	Metal-bound LMW Compounds Range (μg g^{-1}) Wet Weight of Tissue	Metal-bound LMW Compounds Range (%)
Cd	0.069 - 0.122	0.010 - 0.036	10 - 39
Cr	0.075 - 0.294	0.010 - 0.029	8 - 24
Cu	0.507 - 0.940	0.179 - 0.370	24 - 56
Pb	0.034 - 0.730	0.020 - 0.075	4 - 56
Zn	7.0 - 15.7	1.5 - 3.4	15 - 46

CONCLUSION

The novel use of a blending system (Stomacher) to prepare cytosolic extracts from fresh mussel tissue offers important advantages over classical devices which are based on the cutting process. The proposed form of homogenization avoids metal contamination normally found to be significant with other homogenization systems. The proposed method also allows a fast LMW metal compound extraction from mussel tissue in which the homogenization process is complete within 5 min. The fractions of metals, such as Cd, Cu, Cr, Pb and Zn, associated to LMW compounds in mussels can be measured under the optimized ETAAS and FAAS, resulting in simpler and less expensive methods than those based on hyphenated techniques (such as HPLC-ICP-MS). The limits of detection (LOD) for Cd, Cr, and Pb were 0.7, 3.0, and 6.6 ng g^{-1}, respectively, and for Cu and Zn they were 0.05 and 0.01 μg g^{-1}, respectively. The proposed methods are sensitive and precise (RSDs lower than 10% for repeatability), and they can be applied as a first approach to measure the total concentration of metals bound to LMW compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Secretaría Xeral de Investigación and Consellería de Medio Ambiente-Xunta de Galicia for financial support (research projects PGIDIT01MAM20902PR and PGIDIT02PXIB20901PR) and the Unidade de Control de Moluscos, Instituto de Acuicultura at the University of Santiago de Compostela for providing the mussel samples. R.S.-F. would like to acknowledge financial support from the British Geological Survey (BGS, Nottingham, UK). S.S.-R. would like to thank for the financial support from Consellería de Educación e Ordenación Universitaria-Xunta de Galicia.

Received July 31, 2003.

REFERENCES

1. M. Nordberg, Talanta 46, 243–254 (1998).
2. A. Viarengo, B. Burlando, F. Dondero, A. Marro, R. Fabbri, Biomarkers 4, 455–466 (1999).
3. A. Prange, D. Schaumlöffel, Anal. Bioanal. Chem. 373, 441–453 (2002).
4. G. Isani, G. Andreani, M. Kindt, and E. Carpene, Cell. Mol. Biol. 46, 311–330 (2000).
5. F. Geret, F. Rainglet, and R. P. Cosson, Mar. Environ. Res. 46, 545–550 (1998).
6. F. Geret, F. Rainglet, R. P. Cosson, and J. Rech. Oceanogr. 22, 151–156 (1997).
7. C. Wolf, U. Rösick, and P. Brätter, Fresenius' J. Anal. Chem. 368, 839–843 (2000).
8. C. Wolf, U. Rösick, and P. Brätter, Anal. Bional. Chem. 372, 491–494 (2002).
9. C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco, and A. Sanz-Medel, Anal. Chem. 72, 5874–5880 (2000).
10. G. Roesijadi and B. A. Fowler, Methods Enzymol. 205, 263–273 (1991).
11. C. N. Ferrarello, M. R. Fernández de la Campa, H. Goenaga-Infante, M. L. Fernández-Sánchez, and A. Sanz-Medel, Analusis 28, 351–357 (2000).
12. K. Polec, J. Szpunar, O. Palacios, P. González-Duarte, S. Atrian, and R. Lobinski, J. Anal At. Spectrom. 16, 567–574 (2001).
13. J. P. Valles-Mota, A. R. Linde-Arias, M. R. Fernández de la Campa, J. I. García-Alonso, and A. Sanz-Medel, Anal. Biochem. 282, 194–199 (2000).
14. R. Lobinski, H. Chassaigne, and J. Szpunar, Talanta 46, 271–289 (1998).
15. C. N. Ferrarello, M. Montes-Bayón, M. R. Fernández de la Campa, and A. Sanz-Medel, J. Anal. At. Spectrom. 15, 1558–1563 (2000).
16. P. Bermejo-Barrera, S. Fernández-Nocelo, A. Moreda-Piñeiro, and A. Bermejo-Barrera, J. Anal. At. Spectrom. 14, 1893–1900 (1999).
17. P. Bermejo-Barrera, O. Muñiz-Naveiro, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, Anal. Chim. Acta, 439 (2001) 211
18. P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, O. Muñiz-Naveiro, A. M. J. Gómez-Fernández, A. Bermejo-Barrera, Spectrochim. Acta Part B, 55 (2000) 1351.
19. Statgraphics Plus, V. 5.0, Reference Manual, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA, Ch. 14, pp 14-1 to 14-19 (1992).
20. T. A. M. Ure, L. R. P. Butler, B. V. L'vov, Y. Rubenska, and R. Sturgeon, Pure Appl. Chem. 64, 253–259 (1992).

Sensitive STAT-FAAS Determination of Cadmium in Seafood Products

Sandra Santiago-Rivas, Antonio Moreda-Piñeiro, Adela Bermejo-Barrera, and *Pilar Bermejo-Barrera
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela
Avenida das Ciencias, s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

Six different designs of silica-slotted tube atom traps (STATs), which are positioned on a conventional burner head from a flame atomic absorption spectrometer, were used and compared in terms of sensitivity in the determination of cadmium in mussel samples. Different parameters affecting the design of STATs, such as the length of the tube, the outer and inner diameters, the length of the base and exit slots, the angle between the base and exit slots, and the use of exit holes instead exit slots, were evaluated. The STATs showing low outer and inner diameters and a disposition of 120° between the base and exit slots have led to a sensitivity enhancement of around 3.9-fold. Matrix effect was minimized with all proposed STATs and cadmium determination by STAT-FAAS can be carried out with aqueous calibrations. Finally, good repeatability and accuracy, assessed after analyzing DOLT-3, TORT-1, and GBW 08571 certified reference materials, were achieved for all STATs.

INTRODUCTION

Cadmium is a volatile element which can be easily atomized without any interference in an air–acetylene flame (1). However, the main drawback when determining cadmium by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) is its low characteristic concentration, around 0.02 mg L^{-1} at the 228.8-nm resonance line. The low sensitivity is inherent to the flame atomization process itself and is associated with a poor efficiency of the nebulizer system and the short residence time of the analyte atoms in the optical path. Since cadmium occurs at very low concentrations, the sensitivity provided by conventional FAAS is not low enough to directly assess cadmium in biological and environmental samples. To overcome this problem, preconcentration methods based on solvent extraction and solid phase extraction have found wide application (2). Most of these procedures have been used, mainly after the development of the flow injection technique. As an alternative to these preconcentration methods, improvements in the efficiency of sample solution introduction into the FAAS have been made by developing high efficiency nebulizers (3,4) and making other modifications that allow the analyte atoms to remain longer in the optical path such as atom trapping systems (5).

In accordance with Matusiewic (5), atom trapping systems can be grouped into four basic classes: long path absorption tubes (LPAT), the Delves micro sampling cup technique, slotted-tube atom traps (STAT), and water-cooled atom traps (WCAT). The simplest STAT systems, first used by Walting (6), are double-slotted tubes which are placed above the burner and allow entrance of the flame gases and analyte atoms through the base slot. Finally, WCAT devices, which are silica tubes positioned just below the optical path of the spectrometer, are normally cooled by a rapid flow of cold water through the silica tube (7). This last device can be considered as an *in situ* preconcentration system because analyte atoms condense onto the outer surface of the cooled tube when cold water is flowing through the silica tube. On switching off the flow of the coolant, the silica tube undergoes fast heating and the condensed atoms are released as free atoms. Combining the STAT and WCAT systems has resulted in a new atom trap, the slotted-tube, water-cooled atom trap (STWCAT) which consists of a STAT and a silica tube WCAT (8). This system works similar to the WCAT devices except with the difference that released atoms are confined inside the STATs. These devices can be considered as integrated atom traps (IATs) (5) and, as suggested by Matusiewicz and Kopras, they can work as conventional atom traps, also referred to as the "flame alteration technique" (9).

STATs are simpler and easier to operate than other atom traps. Usually they are made of silica and can be easily manufactured in the laboratory. However, the main drawback of silica STATs is the divitrification process, attributed to sodium migration into the silica and to metal oxide deposits. This process continuously changes the silica tube surface and poor repeatability of measurements as well as analytical signal depression results (10). The divitrification process can be prevented by *in situ* coating of the inside surface with an aluminum sulphate (8), lanthanum chloride (8), or vanadium (11) (from ammonium vanadate) solution. Alternatively, the use of tubes made of titanium, nickel, copper, and stainless steel has been reported (12,13). However, most of the recent applications, including

*Corresponding author.
E-mail: pbermejo@usc.es
Tel.: + 34 981 591079,
Fax: + 34 891 595012

interference studies (10), new injection systems (14), and the development of new re-volatilization techniques (15), have been carried out with conventional silica double-slotted tubes (11,16-21).

The aim of the current work was to make a comparative study of new designs of silica STATs for the determination of cadmium in mussel digests. Double-slotted tube atom traps, showing base and exit slots conventionally positioned with 180° between them or positioned with 120° and different outer and inner diameters, and single-slotted tube atom traps, showing a base slot, with exit holes centrally drilled above the base slot and different outer and inner diameters, were tested and compared.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

An AAnalyst™ 200 atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), equipped with an air/acetylene flame, a deuterium lamp as a background correction system, and an inert plastic high precision nebulizer, was used for all determinations. The source of radiation was a PerkinElmer Cd Lumina™ hollow cathode lamp. A universal quartz cell holder (PerkinElmer) was used to mount the STATs on the burner system. A vibrating ball mill (Retsch, Haan, Germany), equipped with zircon cups (15 mL in size) and zircon balls (7 mm diameter), was used for pulverizing the samples. A Model 77530 LYPH-LOCK® 6-liter freeze-dry system (Labconco Corporation, Kansas City, KS, USA) was used for lyophilizing the mussels. A Taurus domestic microwave oven (Barcelona, Spain), programmable for time and microwave power from 150 to 800 W, was used to assist the sample acid digestion. The low-pressure poly(tetrafluorethylene) (PTFE) bombs were laboratory-made and hermetically sealed.

Slotted-tube Atom Traps (STATs)

All STATs were made of silica by the "Servicio de Soplado de Vidrio" at the University of Santiago de Compostela. The first STAT, called STAT-I (Figure 1a) was 139 mm long, 13 mm o.d and 11 mm i.d, with a centralized longitudinal base slot of 17 × 3 mm, and six 4-mm diameter holes placed 15 mm apart and centrally drilled above the base slot. STAT-II (Figure 1b) was similar to STAT-I but narrower (11 mm o.d and 9 mm i.d). STAT-III (Figure 1c) had a 140-mm overall length (13 mm i.d and 11 mm o.d) with a 100 × 3-mm base slot and a 60 × 3 mm exit slot, positioned with a 120° angle between them. STAT-IV (Figure 1d) was similar to STAT-III but with a 12-mm o.d. and 8-mm i.d. STAT-V (Figure 1e) was similar to STAT-III but shorter (135 mm long) and with a larger exit slot (75 × 3 mm). Finally, STAT-VI (Figure 1f) was 140 mm long (12 mm o.d. and 8 mm i.d.) with a base slot (100 × 2 mm) and an exit slot (76 × 2 mm), positioned with a 180° angle between them. In order to avoid devitrification of the silica tubes, a 0.5% $LaCl_3$ solution was aspirated for 5 min.

Reagents and Standard Solutions

All chemicals were of ultra pure grade. Milli-Q™ ultra pure water, resistance 18 MΩ cm (Millipore Co., Bedford, MA, USA), was used throughout this study.

$Cd(NO_3)_2$ stock standard solution, 1.000 g L^{-1}, was supplied by Merck (Poole, Dorset, UK).

A 10% (m/v) lanthanum chloride solution, for coating the quartz tubes, was prepared from lanthanum chloride, $LaCl_3 \cdot 7\ H_2O$, supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

Nitric acid (70.0%) was purchased from Merck, while hydrogen peroxide (33%) was from Panreac.

DOLT-3 (Dogfish Liver) and TORT-1 (*Lobster Hepatopancreas*) were from National Research Council of Canada and GBW 08571 (Mussel) was from Research Center for Eco-Environmental Sciences (Beijing, China).

Mussel Samples

All mussel soft tissues (muscle and gill) were homogenized by blending and lyophilizing at -40°C for two weeks. The dry mussels were then pulverized in a vibrating zircon ball mill for 45 minutes (power at 75%).

Microwave Acid Digestion Procedure

The microwave-induced acid digestion procedure is based on a previous wet sample pretreatment (22) with modifications. Around 0.2 g of dry sample was weighed into the PTFE bombs and 2 mL of nitric acid was added. Since PTFE bombs, suitable for working at low pressure, were used, the samples were subjected to six microwave irradiation cycles at 200 W for 1 min, with a cooling stage in an ice bath for 5 min in between. Then, 1 mL of hydrogen peroxide was added and the samples were again subjected to six microwave irradiation cycles at 300 W for 1 min, with cooling stages of 5 min in between. Finally, the acid digests were made up to 10 mL volume with ultrapure water and stored in polyethylene bottles at 4°C.

FAAS Determination

Cadmium was determined by STAT-FAAS under the instrumental conditions listed in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

Because of the large number of combinations involving different

Atomic Spectroscopy
Vol. 26(5), Sept./Oct. 2005

TABLE I
Instrumental Conditions for Cadmium Determinations

Wavelength	228.8 nm
Spectral Band Pass	0.7 nm
Hollow Cathode Lamp Current	8 mA
Air/acetylene Flame Flow Rate	6.0/2.0 L min^{-1}
Background Correction	D_2 Lamp
Delay Time	3 s
Replicates	5
Aqueous Calibration	0.0–0.5 mg L^{-1}

TABLE II
Increases in Sensitivity of Cd Determination by STAT–FAAS

	Length (mm)	o.d.– i.d. (mm)	Length Base Slot (mm)	Length Exit Slot (mm)	Base and Exit Slot Angle (°C)	Increase (–fold)[a]
STAT–I	135	13 – 11	17	–[b]	180	1.8
STAT–II	139	11 – 9	17	–[b]	180	2.1
STAT–III	140	13 – 11	100	60	120	3.0
STAT–IV	140	12 – 8	100	60	120	3.9
STAT–V	135	13 – 11	100	75	120	3.1
STAT–VI	140	12 – 8	100	75	180	3.1

[a] The increase was calculated as the ratio of the mean slopes (n = 5) of the calibration graph for STAT–FAAS and the mean slope (n = 5) of the calibration graph for conventional FAAS.

[b] Six 4-mm diameter holes placed 15 mm apart and centrally drilled above the base slot.

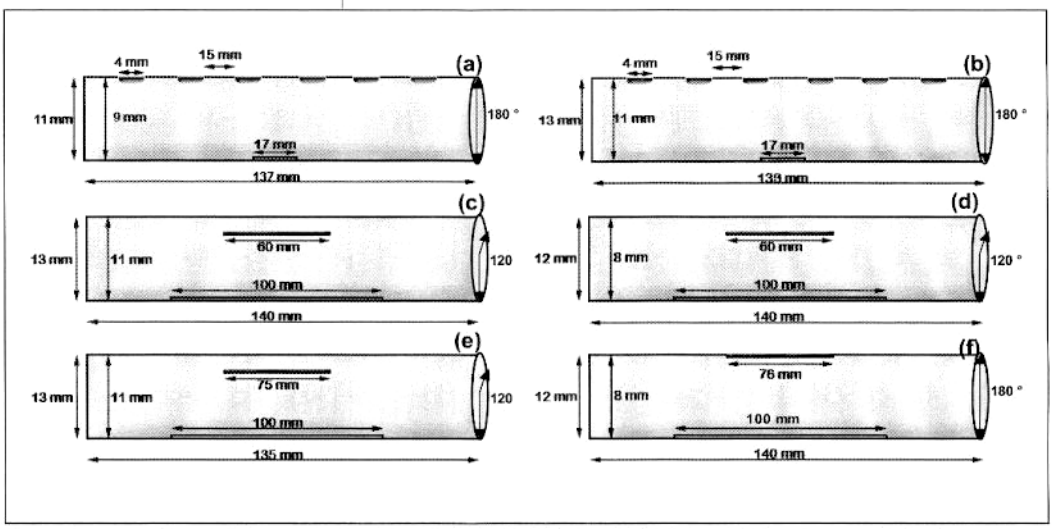


Fig. 1. Diagrams of the STAT designs: (a) STAT–I, (b) STAT-II, (c) STAT–III, (d) STAT–IV, (e) STAT–V, and (f) STAT–VI.

lengths, outer and inner diameters, lengths of the base and exit slots, as well as the position of both slots (angle between base and exit slots) or the presence of exit holes instead exit slots, only some values for these parameters, selected from available literature, were used to design the STATs. These values are summarized in Table II and diagrams of the six STATs under investigation are given in Figure 1. Table II also lists the increases in sensitivity as a ratio of the mean slopes (n = 5) of the calibration graph obtained with each STAT and the mean slope (n = 5) of the calibration graph under conventional FAAS. From Table II it can be concluded that low sensitivity enhancements (1.8- and 2.1–fold) are achieved when the exit holes are used instead of the exit slots and also when using small base slots (STAT–I and STAT–II). When comparing STAT–III and STAT–IV, it can be seen that a narrower tube (12 mm o.d. and 8 mm i.d.) offers the highest sensitivity enhancement (3.9–fold). The length of the tube

and the length of the exit slot do not change the sensitivity, as can be seen when the sensitivity enhancements for STAT-III and STAT-V (3.5-fold for both STATs) are compared. In addition, as is shown in Table II for STAT-IV and STAT-VI, a 120° position between the base and exit slots gives the highest enhancement.

In summary, it can be said that the internal volume (outer and inner diameters) and the position of the base and exit slots are the most important parameters affecting the design of STATs. From Table II it can be seen that the highest increases in sensitivity are related to the use of narrower tubes: 11 mm o.d. and 9 mm i.d. (STAT-II, when compared to STAT-I) and 12 mm o.d. and 8 mm i.d. (STAT-IV, when compared to STAT-III). These findings agree with those recently published by Yaman (21) who found a 10-fold Cd sensitivity enhancement when using narrower tubes, around 60–70 mm. The author of the current study has also used shorter exit slots (lengths between 23 and 40 mm) and longer exit slots (between 60 and 75 mm). The short length for the exit slot combined with narrow tubes can explain the great enhancement on sensitivity reported by Yaman (21).

On the other hand, high enhancements in sensitivity are also obtained when using base and exit slots positioned at 120° between them. The high sensitivity when positioning the base and exit slots at 120° can be explained by the fact that the flame does not easily find the exit slot and must curve itself to find the exit. Thus, flame gases and analyte atoms remain longer inside the slotted tube, achieving a higher sensitivity than when using the classical 180° configuration. Finally, the use of exit slots offers a better sensitivity than with exit holes. The sensitivity enhancement found for cadmium, 3.9 for STAT-IV (Table II), is actually greater than the reported value for the Varian Atom Concentrator Tube (ACT-80), at around 2.3 for cadmium (23).

Matrix Effect

The effect of the mussel digest matrix on the determination of cadmium when using STAT-FAAS was studied. Different aliquots of a mussel digest were spiked with cadmium at concentrations of 0.25, 0.35, and 0.50 mg L^{-1} and the standard addition graph was obtained for each STAT. Similarly, aqueous calibrations covering the 0.00–0.50 mg L^{-1} concentrations range were also established. Table III lists the mean slopes (n = 5) of both calibration and standard addition graphs for each case. After statistical comparison (Cochran's C test at 95.0% to compare variances and the ANOVA test to compare the means) of the slopes of aqueous calibration and standard addition graphs, it can be said that there are statistically significant differences between the slopes of the aqueous calibration and standard addition graphs only when using conventional FAAS. This means a significant matrix effect in the determination of cadmium by FAAS and a decrease in matrix effect when using the STAT-FAAS methodology.

Sensitivity

From Table III it can be seen that the slope of the calibration graph is high when using STAT-V, STAT-VI, and especially STAT-IV. This is related to the sensitivity or characteristic concentration, commonly defined for FAAS as the analyte concentration which gives 0.0044 absorbance units. This parameter including the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) are listed in Table IV, defined as 3 σ/m and 10 σ/m, respectively (where σ is the standard deviation of 11 replicate measurements of a blank and m is the slope of the aqueous calibration graph). Again, it can be noted that the sensitivity and the LODs and LOQs are 4-fold higher for STAT-FAAS (the STAT-III and STAT-IV designs) than when using conventional FAAS.

Precision and Accuracy

The precision of the methods was evaluated through repeatability of the overall procedure. A mussel sample was subjected five times to the microwave-assisted acid digestion procedure and each mussel digest was analyzed twice by STAT-FAAS. The results, expressed as %RSD, are given in Table IV. It can be seen that precision is not affected by the STAT design.

TABLE III
Mean Slopes for Calibration and Standard Addition

	Mean Slope ± S.D. (L mg^{-1})[a]	
	Aqueous Calibration	Standard Addition
Conventional:	0.181 ± 0.028	0.144 ± 0.037
FAAS:		
STAT-I	0.298 ± 0.028	0.292 ± 0.039
STAT-II	0.336 ± 0.103	0.348 ± 0.102
STAT-III	0.520 ± 0.080	0.502 ± 0.071
STAT-IV	0.635 ± 0.160	0.644 ± 0.153
STAT-V	0.475 ± 0.091	0.510 ± 0.068
STAT-VI	0.498 ± 0.032	0.511 ± 0.039

[a] n = 5.

The accuracy of the methods was assessed by analyzing the three certified reference materials DOLT-3, TORT-1, and GBW 08571. Each certified reference material was subjected to a microwave acid digestion process five times and each digest was measured once. The cadmium concentrations found as well as the cadmium certified concentrations in each certified reference material are listed in Table V. It can be seen that good agreement of the cadmium levels was found for all STATs with the certified cadmium concentrations. The most critical parameter affecting the accuracy when using STAT-FAAS was the background signal, the magnitude of which depends on the design of the STATs. To prove this, a series of analyses of the GBW 08571 and TORT-1 certified reference materials were performed without using the background correction system. A lack of accuracy was obtained for all STATs (cadmium concentrations were from 20 to 40% higher than the certified values), except for tubes showing exit holes (STAT-I and STAT-II), which offered accurate cadmium concentrations. Therefore, it can be said that the magnitude of the background signal in STAT-FAAS is higher for double-slotted tubes, and background correction is necessary to achieve accurate results.

TABLE IV
Sensitivity, LOD, LOQ, and Repeatability of the Methods

	LOD ($\mu g\ g^{-1}$)	LOQ ($\mu g\ g^{-1}$)	Sensitivity ($\mu g\ g^{-1}$)	RSD (%)[a]
Conventional	1.48	4.93	0.031	
FAAS:				
STAT-I	1.16	3.87	0.013	3
STAT-II	0.38	1.27	0.012	6
STAT-III	0.26	0.88	0.009	6
STAT-IV	0.27	0.90	0.006	5
STAT-V	0.49	1.62	0.009	6
STAT-VI	0.53	1.77	0.008	6

[a] Repeatability of the overall procedure for n = 5.

TABLE V
Analysis of Different Certified Reference Materials

	GBW 08571	DOLT - 3	TORT - 1
Certified Value ($\mu g\ g^{-1}$)	4.5 ± 0.5	19.4 ± 0.6	26.3 ± 2.1
Found Value ($\mu g\ g^{-1}$)[a]			
STAT-I	4.6 ± 0.3	19.7 ± 0.3	26.3 ± 0.4
STAT-II	4.1 ± 0.1	18.8 ± 0.5	24.8 ± 0.6
STAT-III	4.9 ± 0.4	19.0 ± 0.5	25.7 ± 0.5
STAT-IV	4.9 ± 0.1	19.4 ± 0.4	27.8 ± 0.7
STAT-V	4.9 ± 0.1	19.4 ± 0.4	27.8 ± 0.7
STAT-VI	4.1 ± 0.2	19.6 ± 0.2	27.0 ± 0.6

[a] n = 5.

CONCLUSION

The results of this study show that all STAT designs increase the sensitivity in the determination of cadmium by FAAS 2.0- to 4.5-fold. The STATs involving narrow tubes (small o.d. and small i.d.) and the base and exit slots positioned at 120° offered the highest sensitivity enhancements. Other parameters such as the length of the tube or the length of the exit slot were found to be less important. In addition, the sensitivity is better when using exit slots rather than exit holes. The use of all STATs led to cadmium determinations without matrix effect, which is a practical advantage because aqueous calibration is possible. Good precision and accuracy was obtained for all studied STATs. For the most sensitive FAAS determination of cadmium, best results were obtained when using STAT-IV, STAT-V, and STAT-VI.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank PerkinElmer for providing the AAnalyst 200 atomic absorption spectrometer for this study. S. S-R. is thankful for the financial support provided by "Conselleria de Educación e Ordenación Universitaria - Xunta de Galicia" for a Ph.D. grant.

Received April 21, 2005.

REFERENCES

1. B. Welz and M. Sperling, Atomic Absorption Spectrometry, Third Ed., Chapter 9, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany (1999).
2. M.G. Pereira and M.A.Z. Arruda, Mikrochim. Acta 141, 115 (2003).
3. E. Ivanova, G. Schaldach, and H. Berndt, Fresenius J. Anal. Chem. 342, 47 (1992).
4. J.L. Todoli, A. Canals, and V. Hernandis, Spectrochim. Acta Part B 48, 373 (1993).
5. H. Matusiewicz, Spectrochim. Acta Part B 52, 1711 (1997).
6. R.J. Watling, Anal. Chim. Acta 181, 94 (1977).
7. C. Lau, A. Held, and R. Stephens, Can. J. Spectrosc. 21, 100 (1976).
8. A.D. Turner and D.J. Roberts, J. Anal. At. Spectrom. 11, 231 (1996).
9. H. Matusiewicz and M. Kopras, J. Anal. At. Spectrom. 12, 1287 (1997).
10. D. Korkmaz, M. Mahmut, R. Helles, N. Ertas, and O.Y. Ataman, J. Anal. At. Spectrom. 18, 99 (2003).
11. M. Yaman, J. Anal. At. Spectrom. 14, 275 (1999).
12. J. Khalighie, A.M. Ure, and T.S. West, Anal. Chim. Acta 134, 271 (1982).
13. C. M. Lau, A.M. Ure, and T.S. West, Anal. Chim. Acta 141, 213 (1982).
14. A. Gaspar and H. Berndt, Anal. Chem. 72, 240 (2000).
15. D. Korkmaz, S. Kumser, N. Ertas, M. Mahmut, and O.Y. Ataman, J. Anal. At. Spectrom. 17, 1610 (2002).
16. M. Yaman, Y. Dilgin, and S. Gucer, Anal. Chim. Acta 410, 119 (2000).
17. A.A. Carbonell-Barrachina, E. García, J. Sánchez-Soriano, P. Aracil and F. Burló, J. Agric. Food Chem. 50, 3738 (2002).
18. N. Ertas, D.K. Korkmaz, S. Kumser and O.Y. Ataman, J. Anal. At. Spectrom. 17, 1415 (2002).
19. M. Yaman and S. Bakirdere, Mikrochim. Acta 141, 47 (2003).
20. M. Yaman and I. Akdeniz, Anal. Sci. 20, 1363 (2004).
21. M. Yaman, Anal. Biochem. 339, 1 (2005).
22. P. Bermejo-Barrera, S. Fernández-Nocelo, A. Moreda-Piñeiro and A. Bermejo-Barrera, J. Anal. At. Spectrom. 14, 1893 (1999).
23. J. Moffett, Sensitivity enhancement for flame atomic absorption spectrometry using an atom concentrator tube, the ACT-80, Varian AA instrument at work (1989), www.http://varianinc.com

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Talanta xxx (2006) xxx–xxx
Talanta
www.elsevier.com/locate/talanta

Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry

Sandra Santiago-Rivas, Antonio Moreda-Piñeiro, Adela Bermejo-Barrera, Pilar Bermejo-Barrera *

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias, s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 2 February 2006; received in revised form 17 July 2006; accepted 24 July 2006

Abstract

A rapid method for the determination of Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn binding metallothionein-like proteins (MLPs) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry was developed. The method uses a short column (8 mm × 75 mm) anion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) with inductively coupled plasma-optical emission spectrometric (ICP-OES) detection. Working in isocratic mode (75 mM Tris–HCl at pH 7.4, flow rate at 0.8 ml min^{-1}), two major MLPs isoforms (MLP-1 and MLP-2) can be separated in ten minutes. The distribution of basal metals binding MLPs was assessed by on line HPLC and ICP-OES, while the basal contents of metals binding MLPs were obtained after off line HPLC and ICP-OES (collection of the two major fractions and multi-element determination by ICP-OES). The calculated LODs were 81, 6, 10, 13, 30, 9 and 123 ng g^{-1} for Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn binding MLP-1 and MLP-2, respectively. The repeatability of the over-all method (five different mussel cytosols prepared from the same mussel sample and subjected to the off line HPLC–ICP-OES procedure twice) was from 11.2 for Cu to 16.2% for Zn. The method was finally applied to different raft mussels from Ría de Arousa estuary in order to know basal levels of elements binding MLPs.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metallothionein-like proteins; Trace elements; Mussel; High performance liquid chromatography; Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry

1. Introduction

There are several metal-binding proteins in living organisms, mainly enzymes (metalloenzymes) and metal-binding proteins which transport metals or acts as metal store in the body. Most of them play crucial roles in the optimal healthy status of the living organisms, but also in some pathological disorders [1]. Metallothioneins, MTs, are non-enzymic metal-binding proteins characterized by low molecular weight, high content of cysteine residues, lack of aromatic amino acids and high resistance to heat. These proteins have been described as physiologically multifunctional because they are involved in the transport, storage and detoxification of metals. Their sulphydryl-rich primary structure confers them with a high capacity for metal binding, mainly copper, cadmium and zinc [2]. These metal-binding proteins, firstly discovered in mammalians, have been observed in a wide range of marine invertebrates [3]. Therefore, MTs isolated from invertebrates are preferably called as metallothionein-like proteins (MLP) rather than metallothioneins.

MLPs in mollusks can be considered as a kind of stress proteins which are particularly responsive to heavy metals, although some recent studies have concluded that the biosynthesis of MLPs can be induced by hydrocarbons [4] and herbicides [5], which reduce the metal (Cu, Zn and Cd) content in MLPs and increase the total protein content. These results suggest that MTs and MLPs induction may not be considered as specific biomarkers of metal exposure, although most of the MTs and MLPs induction in living organisms is attributed to heavy metals [6] and there is a well-established relationship between MLPs and Cd, Cu and Zn [7,8].

* Corresponding author. Tel.: +34 981 591079; fax: +34 891 595012.
E-mail address: pbermejo@usc.es (P. Bermejo-Barrera).

0039-9140/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

Isolation procedures based on ion exchange properties and electrophoresis has led to the recognition of a variety of forms of metallothioneins which were subsequently shown to differ in amino acid composition and sequence. In mammalians, there are at least two major isometallothioneins (metallothioneins isoforms) numbered according to the order in which they elute from anion exchanger as metallothionein-1 (MT-1) and metallothionein-2 (MT-2) [9]. Advances in high performance liquid chromatography (HPLC) combined with sensitive spectrometric detectors have aided the resolution of not only differently charged MT isoforms but also other polymorphic variants not separated by classical chromatographic procedures. Thus, several MT subisoforms have been reported, mainly MTs subisoforms isolated from mammalians [10–13].

Beside anion exchange-HPLC and capillary electrophoresis separation procedures, size exclusion and reversed phase-HPLC combined with element or molecular mass spectrometric techniques have been widely used for the identification, characterization and determination of metal-binding proteins [1], and specially, MTs and MLPs [2,14]. These hyphenated HPLC and, mainly, inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) are commonly used to perform multielement trace-element speciation in metal-binding proteins. Some developments and applications of speciation of metals binding MTs have been carried out for standard MTs isolated from rabbit liver [13,15], rat liver [16,17], human liver [18,19] and for MLPs in mussels [7,8,20].

In this work, on line and off line anion exchange-HPLC–ICP-OES procedures have been developed to determine basal levels of Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn binding MLPs in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). One of the main aims of the current work has been the optimization of an isocratic anion exchange, HPLC separation of MTs-like proteins, which has led the resolution of the two major MLPs isoforms (MLP-1 and MLP-2) in 10 min. The distribution pattern of these elements among different MLPs isoforms, mainly MLP-1, has been analyzed for different raft mussel from unpolluted areas in Ría de Arousa estuary.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

An Optima 3300 DV inductively coupled plasma optical emission spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) with a GemCone nebulizer on a cyclonic spray chamber and an autosampler AS 91 (Perkin-Elmer) was used in the current study. The chromatographic system consisted of a Waters 515 HPLC pump (Waters, Milford, MA, USA) and a Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA) injector with a loop volume of 200 μl. A Waters 486 absorbance detector (Waters) was used for metallothioneins-like proteins UV detection, using Millennium (Waters) software for data acquisition. A Protein-Pak DEAE-5PW anion exchange 8 mm × 75 mm glass column was obtained from Waters. A Lab Blender Stomacher 400 (Seward Med. Ltd., London, UK) was used to blend and homogenize fresh mussel samples. During the blending process samples were contained in Stomacher closure bags 6041/CLR (Seward). A centrifuge Centromix (Selecta, Barcelona, Spain) and refrigerated centrifuge Laborzentrifugen 2K15 (SIGMA, Osterode, Germany) were used to separate the solid biological material from the cytosolic extract. An ORION 720A plus pH-meter with a glass–calomel electrode (ORION, Cambridge, UK) was also used.

2.2. Reagents

Ultra-pure water, resistance 18 MΩ cm, was obtained from a Milli-Q water purification device from Millipore Co. (Bedford, MA). Rabbit liver metallothioneins MT-1 and MT-2 were purchased from Sigma–Aldrich (Stemheim, Switzerland). Al, Ba, Cd, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn stock standard solutions (1000 mg l^{-1}) were supplied by Merck (Poole, Dorset, UK). Hydrogen peroxide 33% was from Panreac (Barcelona, Spain). Nitric acid 70.0% and hydrochloric acid 37% were from J.T. Baker B.V. (Deventer, Holland). The extracting solution was made from Tris–hydroxymethyl–aminomethane (Sigma–Aldrich), 2-mercaptoethanol (2-MCE) (Sigma–Aldrich), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma–Aldrich) and sodium chloride (Merck).

2.3. Procedure for cytosol preparation

Mussels (*M. galloprovincialis*) were collected from mussel rafts at Ría de Arousa estuary (Galicia, NW Spain) at different sampling sites. After removal of abductor and foot muscles, the soft tissues (muscle and gill) were subjected to an optimized cytosolic preparation method [21] based on a modified protocol of the methods reported by Roesijadi and Fowler [3]. The method consists in weighting around 5.0 g of soft tissue into a Stomacher bags and adding 25 ml of an extracting solution (Tris–HCl (pH 7.4), 0.01 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM 2-mercaptoethanol (2-MEC) and 25 mM NaCl). The mixture was blended at high speed for 5 min, and it was transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 3500 rpm for 30 min. The pellets were separated by decantation and the extracts were transferred into a second centrifuge tube and they were warmed in a water-bath at 60 °C for 15 min. A second centrifugation step at 4 °C and 15300 r.p.m. for 30 min was carried out to separate the tertiary structure proteins which have suffer denaturalization at high temperature. Mussel cytosolic extracts, obtained by decantation, were made up to 25 ml and stored in polyethylene bottles at −20 °C before measurements.

2.4. Anion exchange chromatography on line UV–vis spectrometry–ICP-OES

A 75 mM Tris–HCl (pH 7.4) buffer solution was used as a mobile phase at a flow rate of 0.8 ml min^{-1} (isocratic mode). This mobile phase was previously de-gassed for 15 min in an ultrasonic water-batch. The mussel cytosols were filtered through a 0.45 μm filter, and a 200 μl sample loop was filled. Anion exchange conditions and ICP-OES operating parameters are given in Table 1.

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

Table 1
Anion exchange chromatographic conditions and data acquisition parameters

Injection volume (μl)	200
Flow rate (ml min^{-1})	0.8
Mobile phase composition	75 mM Tris–HCl, pH 7.4
Anion exchange column	ProteinPak DEAE-5PW 8 × 75 mm glass column
Elution mode	Isocratic
Data acquisition	*UV spectrometric detection*
Wavelength (nm)	254
ICP-OES detection	
Forward power (W)	1300
Gas flows (l min^{-1})	
Nebuliser	0.85
Auxiliary	1.0
Coolant	15.0
Nebuliser type	GemCone (cyclonic chamber)
Wavelengths (nm)	Al, 396.153; Ba, 455.403; Cu, 324.752; Fe, 238.204; Mn, 257.610; Sr, 421.552; Zn, 202.548

2.5. Anion exchange chromatography off line ICP-OES

MLP-1 and MLP-2 isoforms fractions (eluted volume of 1.6 ml, chromatographic time between 3.0 and 5.0 min for MLP-1 and within the 6.4–8.4 min range for MLP-2) were collected and they were directly analyzed by ICP-OES (Table 1) using an aqueous calibration.

3. Results and discussion

3.1. Anion exchange chromatography and UV spectrometric detection: optimization of MLP-1 and MLP-2 chromatographic separation

The optimization of the anion exchange chromatographic separation of MLPs isoforms (mobile phase composition and flow rate) has been carried out using UV detection at 254 nm. A Tris–HCl buffer system at pH 7.4 was selected as mobile phase because it is the same medium in which the MLPs are dissolved after cytosol preparation. In addition, according to Ødegård and Luna, similar pHs of the sample solution and the mobile phase allow better separations of metal-binding biomolecules [22]. Therefore, different Tris–HCl buffer solutions at pH 7.4 and at different ionic strengths (Tris–HCl buffer concentrations between 2.0 and 200.0 mM) were tested as a mobile phases. For all these experiments, individual standard rabbit liver MT isoforms or mixtures of MT isoforms (10 mg l^{-1}) as well as mussel cytosols were used. Buffer concentration has the following effect on the separation of MLPs by anion exchange-HPLC. The retention time of the two MLP isoforms are similar a buffer concentration 150–200 mM, and therefore poorly resolved. Resolution improves when buffer concentration is in the range 20–75 mM. It is illustrated on Fig. 1(a and b). At low buffer concentration, i.e. 2, 5 10 and 20 mM Tris–HCl, four subisoforms from MLP-1 were resolved (Fig. 2(a and b)) however, MLP-2 was not eluted within 10 min under the low buffer concentrations (Fig. 2(a and b)). Results agree with those previously reported by Farrarello et al. [13], whose have separated different rabbit liver MT-1 and MT-2 by anion exchange chromatography with gradient elution. They have found partial resolution of MT-1 subisoforms when working with low buffer concentrations.

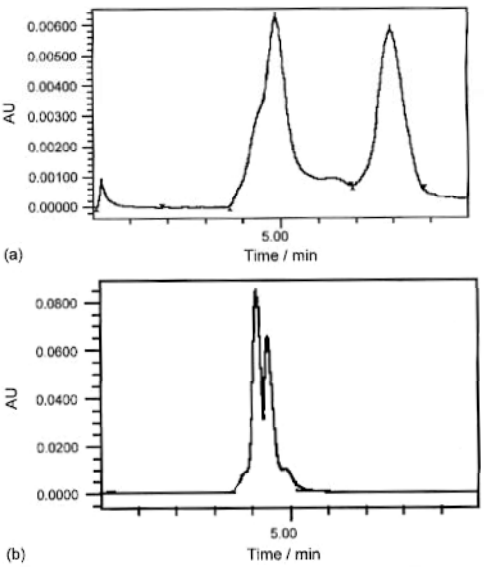


Fig. 1. Anion exchange chromatographs with UV detection (254 nm) for 10 mg l^{-1} standard MT-1 and MT-2 isoforms (rabbit liver) for Tris–HCl buffer concentrations of 75.0 (a) and 200 mM (b).

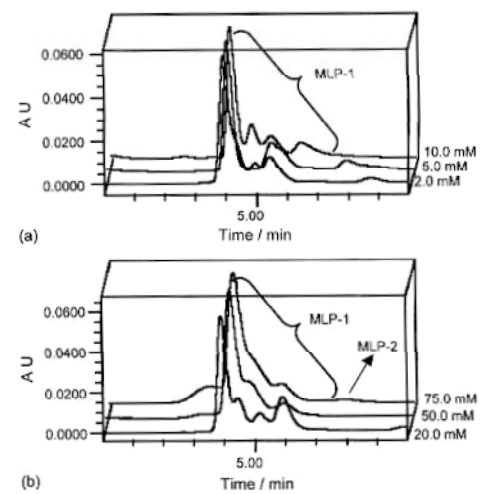


Fig. 2. Anion exchange chromatographs with UV detection (254 nm) for MLP-1 and MLP-2 isoforms from mussel cytosols in function of the Tris–HCl buffer concentration: 2.2, 5.0 and 10.0 mM (a) and 20.0, 50.0 and 75.0 mM (b).

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

When using a buffer concentration of 75 mM three different subisorform from MLP-1 and a small signal corresponded to MLP-2 isoform (7.40 min as retention time) were observed. Therefore, a compromise between MLP-1 and MLP-2 resolution (poor resolution when increasing the buffer concentration) and partial resolution of MLP-1 subisoforms at low buffer concentrations has been considered and a buffer concentration of 75 mM has been chosen.

After studying the mobile phase flow rate between 0.4 and 1.2 ml min^{-1}, a flow rate fixed at 0.8 ml min^{-1} was finally selected. Under these conditions (Fig. 3(a and b)), the MLP-1 isoform elutes from column at 4.01 min and offer a partial resolution of two subisoforms, while the MLP-2 isoform elutes at 7.40 min. It can be seen in Fig. 3(b) that the amount of MLP-2 isoform in the analyzed mussel cytosol is low. It must be said that the retention time for rabbit liver MT-1 and mussel MLP-1 are slight different and a value of 4.84 ± 0.01 min was achieved for six replicates of rabbit liver MT-1. However, retention times for rabbit liver MT-2 and MLP-2 are the same (around 7.40 min). The repeatability of the retention times for both MLP-1 and MLP-2 isoforms was established after performing eleven anion exchange chromatographic separations for a mussel cytosol. Mean retention times for both MLP isoforms were 4.01 ± 0.02 and 7.40 ± 0.05 min for MLP-1 and MLP-2, respectively. The resolution (R), measured as $2(t_{m2} - t_{m1})/(w_1 - w_2)$, was 1.05 ± 0.02.

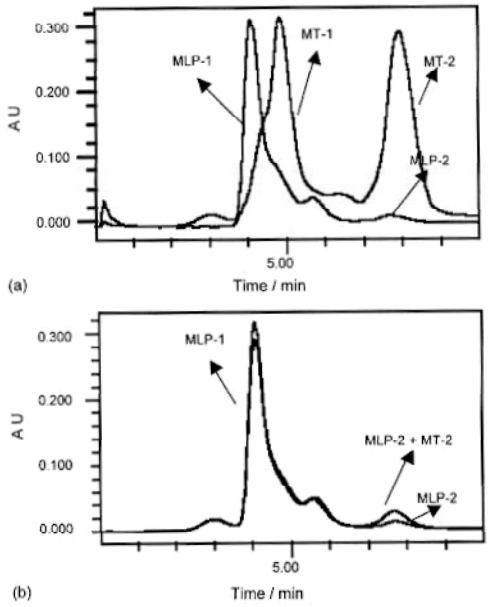


Fig. 3. Anion exchange chromatographs with UV detection (254 nm) under optimised conditions for a mussel cytosol and a mixture of 10 mg l^{-1} of standard rabbit liver MT-1 and MT-2 isoforms (a) and for a mussel cytosol and a mussel cytosol spiked with 5 mg l^{-1} of standard rabbit liver MT-2 (b).

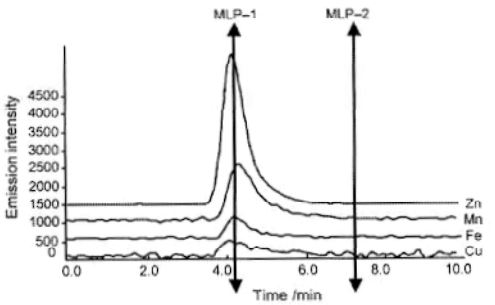


Fig. 4. Anion exchange chromatographs with ICP-OES detection for Cu (324.752 nm), Fe (238.204 nm), Mn (257.610 nm) and Zn (202.548 nm) binding MLPs in mussel cytosols.

3.2. Anion exchange chromatography on line ICP-OES

Anion exchange-HPLC was on line coupled with ICP-OES as a first multi-elemental survey of trace metals associated with MLPs in mussel cytosols. The elution profiles of Cu, Fe, Mn and Zn were directly obtained (Fig. 4) and as it can be seen, all elements investigated are mainly bound to MLP-1 isoform (the amount of MLP-2 is low in mussel cytosols and the concentration of elements associated with must be also low). Similar elution profiles of Al, Ba and Sr (not plotted) were obtained. However, negligible signals were recorded for Cd. Negligible signals for Cd were obtained because of the use of ICP-OES as detector. A more sensitive detector, such as ICP-MS, ICP-OES would be desirable in order to assess low Cd levels binding MLPs. Fig. 5 shows some chromatographs when monitoring Cd, Cu, S and Zn lines for a mixture of 10.0 mg l^{-1} standard rabbit liver MT-1 and MT-2. It can be seen two peaks for these elements related to the two MT isoforms, proving the feasibility of the separation method. This is possible because the MT isoforms from rabbit liver were isolated from Cd-exposed animals.

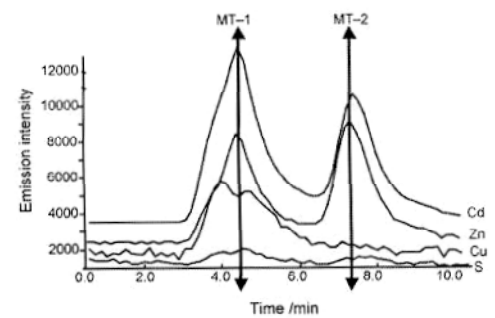


Fig. 5. Anion exchange chromatographs with ICP-OES detection for Cd (238.204 nm), Cu (324.752 nm), S (257.610 nm) and Zn (202.548 nm) binding standard rabbit liver MT isoforms.

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

Table 2
Repeatability of the retention times and peak height for six replicate injections of a mussel cytosol by anion exchange-HPLC–ICP-OES

	MLP-1 isoform			
	Retention time for MLP-1: 4.01 ± 0.02 min			
	Retention time (min)		Peak height/height units	
	$\bar{x} \pm$ S.D.	R.S.D. (%)	$\bar{x} \pm$ S.D.	R.S.D. (%)
Al	4.03 ± 0.15	4	1280 ± 68	5
Ba	4.05 ± 0.13	3	1352 ± 72	5
Cu	4.03 ± 0.18	4	779 ± 51	6
Fe	3.98 ± 0.11	3	627 ± 12	2
Mn	4.08 ± 0.08	2	1674 ± 78	5
Sr	4.07 ± 0.11	3	143255 ± 4727	3
Zn	3.98 ± 0.11	3	4048 ± 98	2

The repeatability of the retention times for each metal associated with MLP-1 was calculated. A same mussel cytosol was injected six times and the metal profiles were obtained. Results are shown in Table 2 where it can be seen that good precision is achieved for all cases. Retention times for element binding MLP-1 were close to the retention time of MLP-1 (UV–vis detection).

3.3. Anion exchange chromatography off line ICP-OES

As the shape of the metal-MLPs in mussel cytosols is unknown, a direct coupling anion exchange-HPLC–ICP-OES can not give information about the concentration of metal binding MLPs because of standards metal-MLPs complexes are not available. Therefore, an off line anion exchange-HPLC–ICP-OES procedure was developed to quantify metals binding MLPs. This has implied the collection of the different fractions eluted from anion exchange column and the analysis of them by ICP-OES under optimum conditions. Two different fractions were collected, the first fraction was corresponded to the MLP-1 isoform (retention time of 4.01 ± 0.02 min), that means an eluted volume of 1.6 ml when the mobile flow rate is 0.8 ml min^{-1} (times between 3.01 and 5.01 min). The second fraction was the MLP-2 isoform (retention time of 7.40 ± 0.05 min). The eluted volume of this fraction is 1.6 ml too and it implies times between 6.40 and 8.40 min. All these fractions were directly measured under optimum ICP-OES operating conditions (Table 1).

3.3.1. Calibration: matrix effects

Aqueous calibration, aqueous calibration matched with 75.0 mM Tris–HCl buffer solution at pH 7.4 and the standard addition technique were established for each element. The metal concentration levels were until 2000 μg l^{-1} for Al, Cu, Fe, Mn and Zn, and until 100 μg l^{-1} for Ba and Sr. The three calibration types were obtained three times for all elements, and the mean slopes were not found statistically significant different at a 95.0% of confidence interval (*t*-test). That means that there are not matrix effect and an aqueous calibration can be used to quantify metal binding MLPs.

3.3.2. Limit of detection and precision

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) defined as follows

$$\mathrm{LOD} = 3\frac{\mathrm{S.D.}}{m}; \qquad \mathrm{LOQ} = 10\frac{\mathrm{S.D.}}{m}$$

where S.D. is the standard deviation corresponding to eleven replicates measurements of a blank (mobile phase), and m is the slope of the aqueous calibration graph, were calculated. The calculated LODs, referred to the wet mussel weight, were 81, 6, 10, 13, 30, 9 and 123 ng g^{-1} for Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn, respectively, while the calculated LOQs, also referred to the wet mussel tissue, were 270, 20, 33, 43, 100, 30 and 410 ng g^{-1} for Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn, respectively.

The repeatability of the over-all method was assessed by determining the amount of elements binding MLP-1 and MLP-2 isoforms in a mussel sample which was prepared as cytosol four times. Each cytosol was analyzed twice by the off line HPLC–ICP-OES method and results, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), were 7, 13, 11, 12, 15, 6 and 16% for metal concentrations of 1.54, 0.37, 0.15, 0.40, 0.12, 6.4 and 0.16 μg g^{-1} of Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn binding MLP-1 isoform, respectively.

3.3.3. Accuracy

Since there are not certified reference materials with certified concentrations for metals binding MTs or MLPs, validation of method was carried out by studying the analytical recovery. However, the performance of the analytical recovery implies the use of standards (metals binding MLPs), which are not available from mussels (there are only available MT-1 and MT-2 standards from rabbit liver with indicative values of Cd, Cu and Zn binding to MTs). Therefore, before performing analytical recovery studies, different volumes of MLP-1 and MLP-2 were isolated from mussel cytosols by anion exchange chromatography. The pools of the isolated MLP-1 and MLP-2 were used as standards for spiking fresh mussel tissue. Firstly, the amount of metal binding MLP-1 and MLP-2 were determined by the off line HPLC–ICP-OES method. Table 3 lists the concentrations of metals binding MLP-1 (the concentrations of metals binding MLP-2 were lower than the LODs). For spiking, volumes of 2.0 and 3.0 ml of the isolated MLP-1 isoform were added to different 5.0 g soft tissues subsamples directly into Stomacher bags and the MLPs extraction procedure, described in Section 2.3, was carried out. After cytosolic preparation, the mussel extracts were analyzed by the off line HPLC–ICP-OES method and the analytical recovery, defined as follows, was calculated.

$$\text{Analytical recovery}(\%) = \frac{[]_{\text{measured}}}{[]_{\text{added}}} \times 100$$

where $[]_{\text{measured}}$ is the concentration of metal binding MLP-1 determined after off line HPLC–ICP-OES and $[]_{\text{added}}$ is the concentration of metal binding MLP-1 added. Similarly, a mussel cytosol without spiking was prepared and the metals binding MLP-1 were determined. Each volume of metals binding MLP-1 "standard" and the mussel cytosol without spiking were prepared three times, and each cytosol was analyzed twice by the off line

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

Table 3
Mean analytical recoveries ($n = 6$) of the method

	Metal binding MLP-1 (mg l^{-1}[a])	Metal binding MLP-1 added (mg l^{-1})		Metal binding MLP-1 measured (mg l^{-1})		Analytical recovery (%)	
		2.0 ml[b]	3.0 ml[b]	2.0 ml[b]	3.0 ml[b]	2.0 ml	3.0 ml
Al	0.134	0.011	0.016	0.009	0.012	82	75
Ba	0.0092		0.0011	–[c]	0.0008	–[c]	76
Cu	0.053	0.004	0.006	0.003	0.004	75	60
Fe	0.393	0.031	0.047	0.034	0.037	108	79
Mn	0.063	0.005	0.008	0.005	0.007	100	96
Sr	0.172	0.014	0.021	0.015	0.018	110	86
Zn	0.566	0.045	0.068	0.029	0.045	64	66

[a] Concentration of metal binding MLP-1 in the MLP-1 "standard solution".
[b] Concentration of metal binding MLP-1 added (2.0 or 3.0 ml made up 25 ml after cytosol preparation).
[c] Not determined.

HPLC–ICP-OES method. Therefore, data in Table 3 are related to six independent determinations. Results indicate that analytical recoveries higher than 60% are obtained for all elements and they are close to 100% for Fe, Mn and Sr binding MLP-1. These implies good accuracy for the mussel cytosol preparation and off line HPLC–ICP-OES methods. Poor analytical recovery for some elements (Cu and Zn) can be attributed to the complexity of the experiment and the degradation of Cu and Zn binding MLPs during the experiment (spiking fresh mussel tissue with metal-binding MLPs, previously isolated from another mussel tissue). According with Wolf et al. [18,19], some metal binding MLPs, especially Zn-MLPs, are easily degraded by temperature and other environmental conditions. Since mussel tissue spiked with metals binding MLPs are subjected to a 60 °C treatment at some point of the cytosolic preparation procedure, degradation of some metal-MLPs complexes can be occurred.

Table 4
Levels of metal binding MLPs expressed as $\bar{x} \pm$ S.D. for four measurements

Element	Sample code	Concentration as μg g^{-1} (wet weight)	
		MLP-1 isoform	MLP-2 isoform
Al	1	<LOD (<0.08)	<LOD (0.270)
	2	0.70 ± 0.08	0.42 ± 0.05
	3	1.21 ± 0.11	0.81 ± 0.09
	4	0.85 ± 0.07	0.59 ± 0.07
	5	1.47 ± 0.15	0.72 ± 0.06
Ba	1	1.75 ± 0.13	0.99 ± 0.09
	2	1.65 ± 0.14	1.01 ± 0.08
	3	0.025 ± 0.002	0.88 ± 0.07
	4	0.029 ± 0.001	<LOD (0.02)
	5	0.056 ± 0.002	<LOD (0.02)
Cu	1	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.04
	2	0.12 ± 0.02	0.043 ± 0.008
	3	0.11 ± 0.03	0.070 ± 0.006
	4	0.14 ± 0.02	0.037 ± 0.005
	5	0.11 ± 0.03	<LOD (0.033)
Fe	1	0.43 ± 0.06	0.34 ± 0.05
	2	0.45 ± 0.08	<LOD (0.043)
	3	0.50 ± 0.06	<LOD (0.043)
	4	0.61 ± 0.05	<LOD (0.043)
	5	0.43 ± 0.06	<LOD (0.043)
Mn	1	0.21 ± 0.04	<LOD (0.100)
	2	0.15 ± 0.03	<LOD (0.100)
	3	0.067 ± 0.003	<LOD (0.100)
	4	0.17 ± 0.03	<LOD (0.100)
	5	0.086 ± 0.005	<LOD (0.100)
Sr	1	4.26 ± 0.23	0.27 ± 0.05
	2	4.60 ± 0.21	0.38 ± 0.06
	3	4.14 ± 0.18	0.46 ± 0.07
	4	5.29 ± 0.29	0.40 ± 0.06
	5	4.43 ± 0.17	0.33 ± 0.07
Zn	1	0.21 ± 0.03	<LOD (0.41)
	2	0.58 ± 0.08	<LOD (0.41)
	3	1.33 ± 0.10	0.63 ± 0.08
	4	0.68 ± 0.07	<LOD (0.41)
	5	0.91 ± 0.08	0.56 ± 0.07

3.4. Application

The developed method was applied to mussels (*M. galloprovincialis*) collected from mussel rafts at five different sampling sites along the Ría de Arousa estuary (Galicia, NW Spain). For each site a composite sample of about 30 mussels was prepared by pooling together specimens of different size, with shell lengths ranging from 3 to 7 cm. Each composite sample was prepared twice as mussel cytosol, and each mussel cytosol was chromatographied also twice. Table 4 lists the concentrations of metals binding MLP-1 and MLP-2 isoforms. It can be seen that all elements are mainly binding MLP-1 isoform, although low levels of Al, Ba, Fe and Sr have been found associated to MLP-2 isoform. Metals concentrations lower than the LODs of the method have been found for some samples, mainly for metals binding MLP-2 isoform.

4. Conclusions

The use of anion exchange-HPLC working in isocratic mode results in a fast MLPs chromatographic separation in mussel cytosols. Under optimum conditions (75 mM Tris–HCl buffer solution at pH 7.4 and flow rate at 0.8 ml min^{-1}) two MLP isoforms can be separated in 10 min, which is a short chromatographic time when comparing to previously published works (between 30 and 60 min). The hyphenation of HPLC and ICP-OES allows the determination of basal levels of Al, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr and Zn binding MLPs in mussels, although more highly sensitive detection techniques are needed to measure basal lev-

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

els of other elements binding MLPs, such as Cd. However, the HPLC–ICP-OES method results feasible to determine basal levels of elements binding to MTs from rabbit liver.

Acknowledgements

The authors would like to thank the "Unidade de Control de Moluscos-Instituto de Acuicultura" at the University of Santiago de Compostela for providing mussel samples. S. S.-R would like to thank financial support provided by "Consellería de Educación e Ordenación Universitaria-Xunta de Galicia" for a doctoral grant.

References

[1] M.B. de la Calle Guntiñas, G. Bordin, A.R. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 369.
[2] M. Nordberg, Talanta 46 (1998) 243.
[3] G. Roesijadi, B.A. Fowler, Meth. Enzymol. 205 (1991) 263.
[4] C. Porte, M. Sole, V. Borghi, M. Martínez, J. Chamorro, A. Torreblanca, M. Ortiz, A. Orbrea, M. Soto, M.P. Cajaraville, Biomarkers 6 (2001) 335.
[5] Y.Y. Mosleh, S. Paris-Palacios, F. Arnoult, M. Couderchet, G. Vernet, Comm. Agric. Appl. Biol. Sci. 68 (2003) 759.
[6] A. Viarengo, B. Burlando, F. Dondero, A. Marro, R. Fabbri, Biomarkers 4 (1999) 455.
[7] C.N. Ferrarello, M.R. Fernández de la Campa, C. Sariego-Muñiz, A. Sanz-Medel, Analyst 125 (2000) 2223.
[8] C.N. Ferrarello, M. Montes-Bayón, M.R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 1558.
[9] K.T. Suzuki, in: M.J. Stillman, C.F. Shaw III, K.T. Suzuki (Eds.), Metallothioneins. Synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes, VCH Publishers Inc., Weinheim, 1992, pp. 14–29.
[10] H. Chassaigne, R. Łobiński, Anal. Chem. 70 (1998) 2536.
[11] H. Chassaigne, R. Łobiński, J. Chromatogr. A 829 (1998) 127.
[12] S. Mounicou, K. Polec, H. Chassaigne, M. Potin-Gautier, R. Łobiński, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 635.
[13] C.N. Ferrarello, M.R. Fernández de la Campa, H. Goenaga-Infante, M.L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, Analysis 28 (2000) 351.
[14] A. Prange, D. Schaumlöffel, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 441.
[15] B. Deng, W.-T. Chan, Electrophoresis 22 (2001) 2186.
[16] K. Polec, J. Szpunar, O. Palacios, P. González-Duarte, S. Atrian, R. Łobiński, J. Anal At. Spectrom. 16 (2001) 567.
[17] K. Polec, O. García-Arribas, M. Pérez-Calvo, J. Szpunar, B. Ribas-Ozonas, R. Łobiński, J. Anal At. Spectrom. 15 (2000) 1363.
[18] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, Fresenius'J. Anal. Chem. 368 (2000) 839.
[19] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, Anal. Bional. Chem. 372 (2002) 491.
[20] K.A. High, B.A. Methven, J.W. McLaren, K.W.M. Siu, J. Wang, J.F. Klaverkamp, J.S. Blais, Fresenius'J. Anal. Chem. 351 (1995) 393.
[21] R. Santamaría-Fernández, S. Santiago-Rivas, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, P. Bermejo-Barrera, S.J. Hill, At. Spectrosc. 25 (2004) 37.
[22] K.E. Ødegård, W. Luna, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 403.

Please cite this article as: Sandra Santiago-Rivas et al., Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Talanta (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.07.038

El estudio de la concentración de metales a nivel traza, es decir, entre los ppm y los ppb, en los diferentes organismos es de relevada importancia tanto por la toxicidad como por la esencialidad que pueden presentar los mismos. Debido al gran interés que en los últimos años suscita todo lo relacionado con la determinación de metales ligados a un tipo de proteínas características, denominadas metalotioneínas (MTs, Metallothioneins), el objetivo primordial de esta tesis ha sido la cuantificación de los metales ligados a éstas.

Nuestro estudio se centró concretamente en las MTs presentes en el mejillón, denominadas en este caso al ser el mejillón un invertebrado, proteínas similares a metalotioneínas (MLPs, Metallothionein Like Proteins). Este tipo de metaloproteínas se caracteriza fundamentalmente por presentar un bajo peso molecular y uniones metálicas a través de puentes disulfuro con el Zinc, el Cobre y el Cadmio. La presencia de metales en el medio induce la biosíntesis de estas proteínas. Por ello, la determinación de la concentración de metal presente en ellas sirve para realizar una estimación directa de la contaminación metálica en un lugar determinado. Otra característica a destacar de estas proteínas es que presentan varias isoformas, siendo las más abundantes la MT-I y la MT-II, lo cual hace atractiva la especiación y la determinación de los metales ligados a cada una de ellas.

El organismo objeto de estudio es el mejillón debido a la importancia que tiene como bioacumulador, siendo así un buen bioindicador de contaminación metálica del medio marino. Además, la importancia económica que el cultivo de mejillón tiene para nuestra comunidad, segunda productora mundial, hace que sea necesario llevar a cabo estudios exhaustivos sobre este importante producto.