

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Nuevos materiales para la especiación de mercurio: biotransformación
de metales en organismos modelo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sonia Zarco Fernández

Directoras

Riansares Muñoz Olivas

Carmen Cámara Rica

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**Nuevos materiales para la especiación de mercurio.
Biotransformación de metales en organismos modelo**

Directoras:

Dra. Riansares Muñoz Olivas

Dra. Carmen Cámara Rica

Sonia Zarco Fernández

Madrid, 2016

Es muy difícil empezar a escribir estas palabras, porque significan el fin de una etapa y el comienzo de otra. Son tantas las experiencias vividas en el laboratorio, que elegir una resulta muy complicado.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directoras, Carmen y Rian, por haberme ofrecido la oportunidad de aprender y comprender lo que es la "Química" y lo frustrante que puede llegar a ser, cuando tras vueltas y vueltas te das cuenta de que continúas en el mismo punto, y que el día menos pensado el cielo se abre y ves claramente hacia dónde continuar, los misterios de la investigación... También me han ayudado a madurar profesional y personalmente haciéndome crecer como persona e investigadora. Por todo esto y más, muchas gracias.

Me gustaría continuar con todos mis compañeros, han sido muchos los que han pasado por el laboratorio en estos años. Con parte de ellos Mabel, Susana, Ani las primeras en abandonar el barco, pasé los primeros años, en los que medir en el ICP era toda una pelea digna del "Pressing catch", en busca de un hueco en ese preciado horario semanal. Noe e Irene, empezamos juntas y vamos casi de la mano por la recta final del camino, ánimo chicas que ya queda menos! También me gustaría agradecer a Ana Coto a enseñarme esa paciencia y saber estar que tanto la caracteriza, me ha encantado conocerte y aunque Oviedo nos pilla más lejos que Plaza Castilla, sé que siempre te tendré cerca. En la última parte, las nuevas incorporaciones, que ya no son tan nuevas Sandra y Mary, me ha gustado mucho trabajar con vosotras e intentar enseñaros el turbio mundo de los polímeros y la ablación láser, espero que al final no fuese tan malo como parecía!!. Y cómo no a Estefi, Laura, Maria y Rakel lo bien que nos lo hemos pasado tanto dentro, cómo fuera del labo, esas risas, gritos y confidencias en el pHmetro, sin vosotras no hubiese sido lo mismo. A Jon, jefecillo de este pHmetro que sirve para todo y con disponibilidad 24H, gracias por ser nuestro MacGyver particular.

Esta tesis también ha sido posible gracias a las múltiples colaboraciones con distintos departamentos. Gracias a MJ porque sin ella, sin su laboratorio y su actitud crítica y coherente no hubiésemos podido llegar al final del túnel. No me olvido de Antonio, todo empezó con una prueba y al final ha terminado con un punto y seguido en búsqueda de nuevos avances.

Gracias al Laboratorio de Química Analítica y bioinorgánica (LCABIE) Instituto Ambiental Multidisciplinar de Investigación sobre el Medio Ambiente y Materiales (IPREM), University of Pau et Pays de l'Adour, por darme la oportunidad de ampliar y aplicar mis conocimientos en la ablación láser, utilizando todos sus medios.

También me gustaría agradecer este trabajo a mis padres, ellos fueron los que me alentaron a estudiar una carrera universitaria y los que me apoyaron cuando me embarqué en esta aventura de la que no estaba muy segura.

Por último lugar, Pablo, llevamos juntos casi una vida, nos conocimos durante la carrera, continuamos durante el máster y sin darnos cuenta nos vimos inmersos en el desarrollo de una tesis. Nadie cómo tú sabe lo que me ha costado llegar hasta el final de este viaje y por fin he llegado a puerto. Gracias por haber estado allí tanto en mis momentos de flaqueo como en los de euforia y gracias por darme esa confianza en mí misma, que a veces se desvanecía.

Muchas gracias a todos los que habéis hecho posible que esta tesis haya sido posible.

	Pág.
Glosario de abreviaturas	1
Figuras y tablas	3
Resumen/Summary	5/7
Objetivos/Aims	9/10
 <u>BLOQUE 1: INTRODUCCIÓN</u>	
 CAPÍTULO 1: CONTAMINANTES OBJETO DE ESTUDIO: DESCRIPTIVA Y PARTICULARIDADES	
	11
 <i>Contaminantes clásicos: Metales</i>	
1.1 Mercurio	12
1.1.1 Antecedentes	12
1.1.2 Mercurio en el medio ambiente	13
1.1.2.1 Ciclo natural del mercurio	14
1.1.2.2 Ciclo antropogénico	14
1.1.2.3 Ciclo biogeoquímico	15
1.1.3 Toxicidad del mercurio y sus especies	18
1.1.3.1 Mercurio elemental	19
1.1.3.2 Mercurio inorgánico	20
1.1.3.3 Mercurio orgánico	20
1.1.4 ¿Cómo y dónde se produce la exposición a mercurio?	21
1.1.4.1 Exposición ocupacional	21
1.1.4.2 Exposición alimentaria	22
1.1.4.3 Exposición iotrógena	23
1.1.4.4 Exposición accidental aguda	24
1.1.5 Tendencias hacia el desarrollo sostenible	25
 1.2 Arsénico	 29
1.2.1 Antecedentes	29
1.2.2 Arsénico en el medio ambiente	30
1.2.2.1 Ciclo biogeoquímico	31
1.2.3 Toxicidad del arsénico y sus especies	32
1.2.4 ¿Cómo y dónde se produce la exposición a arsénico?	34
1.2.4.1 Exposición alimentaria	34
1.2.4.2 Exposición ocupacional	34
1.2.4.3 Exposición en zonas con elevada concentración	35
1.2.5 Tendencias hacia el desarrollo sostenible	36

1.3 Cadmio	37
1.3.1 Antecedentes	37
1.3.2 Cadmio en el medio ambiente	38
1.3.2.1 Ciclo biogeoquímico	38
1.3.3 Toxicidad del cadmio	39
1.3.4 ¿Cómo y dónde se procede la exposición al cadmio?	40
1.3.4.1 Exposición alimentaria	40
1.3.4.2 Exposición ocupacional	40
1.3.5 Tendencias hacia el desarrollo sostenible	41
1.4 Plata	42
1.4.1 Antecedentes	42
1.4.2 Plata en el medio ambiente	43
1.4.2.1 Ciclo biogeoquímico	43
1.4.3 Toxicidad de la plata	44
1.4.4 ¿Cómo y dónde se produce la exposición a la plata?	44
1.4.5 Tendencias hacia el desarrollo sostenible	45
<i>Contaminantes emergentes: Nanopartículas</i>	45
1.5 Quantum Dots	46
1.5.1 Antecedentes	46
1.5.2 Propiedades	46
1.5.3 Aplicaciones	48
1.5.4 Toxicidad de los QDs	49
1.6 Bibliografía	51
CAPÍTULO 2: TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE MERCURIO Y DESARROLLO DE MATERIALES ALTERNATIVOS	
2.1 Técnicas instrumentales para la determinación de especies de mercurio	65
2.1.1 Toma y tratamiento de muestra	66
2.1.1.1 Etapa de digestión	66
2.1.1.2 Etapa de extracción	67
2.1.1.3 Etapa de derivatización	68
2.1.1.4 Etapa de pre-concentración	69
2.1.2 Técnicas de separación y análisis	72
2.1.2.1 Técnicas cromatográficas	72
2.1.2.2 Técnicas no cromatográficas	73

2.2 Materiales poliméricos para la determinación y especiación de mercurio	75
2.2.1 Antecedentes	76
2.2.2 Síntesis y caracterización de materiales altamente selectivos para la retención de Hg	77
2.2.2.1 Constituyentes principales	77
2.2.2.2 Tipos de polimerización	79
2.2.2.3 Técnicas de caracterización	81
2.2.2.4 Aplicaciones concretas para el Hg	85
2.3 Bibliografía	91

CAPÍTULO 3: BIOCONCENTRACIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN ORGANISMOS MODELO

3.1 Biodisponibilidad de una sustancia química	105
3.1.1 Bioacumulación	105
3.1.2 Bioconcentración	106
3.1.3 Biomagnificación	106
3.2 Test OECD 305	107
3.3 Organismos biológicos como modelos “in vivo”	109
3.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
3.3.2 <i>Danio rerio</i>	114
3.4 Bibliografía	118

BLOQUE II: RESULTADOS

A) Nuevos materiales para la especiación de Hg	123
A new specific polymeric material for mercury speciation: Application to environmental and food samples	125
Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species	141

B) Desarrollo de plantas transgénicas para aumentar la tolerancia y acumulación de As	153
Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	157
Cytokinin Determines Thiol-Mediated Arsenic Tolerance and Accumulation	176
C) Estudios de bioconcentración y distribución de metales y nanopartículas, mediante el empleo del pez cebra	193
Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae	195
Bioaccumulation of methylmercury, cadmium, silver and arsenic from exposure to mixtures in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) eleutheroembryos	209
 <u>BLOQUE III: DISCUSIÓN INTEGRADORA Y CONCLUSIONES</u>	
Discusión integradora	227
Conclusiones/Conclusions	235/237
 <u>BLOQUE IV: ANEXO</u>	
Patentes	239

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- AAP:** Academia Americana de Pediatría
- AAS:** Espectroscopía de Absorción Atómica
- ADP:** Adenosina difosfato
- AFS:** Espectroscopía de Fluorescencia Atómica
- AIBN:** Azobisisobutironitrilo
- AsB:** Arsenobetaína
- AsC:** Arsenocolina
- ATP:** Adenosina trifosfato
- ATSDR:** Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
- BCF:** Factor de bioconcentración
- BET:** Isoterma de Brunauer-Emmett-Teller
- BMF:** Factor de biomagnificación
- CAR:** Carboxeno
- CE:** electroforesis capilar
- Cks:** Citoquelatinas
- CT:** Atrapamiento criogénico
- DMA:** Ácido dimetilarsínico
- DMA-80:** Analizador directo de mercurio
- DVB:** Divinilbenceno
- ECD:** Detector de captura electrónica
- EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EGDMA:** Dimetilacrilato de etilenglicol
- EPI:** Programa informático: Oficina de Prevención de la Contaminación y Tóxicos
- EU:** Union Europea
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- FDA:** Agencia de Fármacos y Alimentos
- FID:** Detector de ionización en llama
- FT-IR:** Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
- GACVS:** Gloval advisory Committee on Vacien Safety
- GC:** Cromatografía de gases
- GSH:** Glutación

- HPLC:** Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
- IARC:** Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer
- ICP-MS:** Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente
- IUPAC:** International Union for Pure and Applied Chemistry
- LC:** Cromatografía de líquidos
- LC50:** Concentración media letal
- MAA:** Ácido metacrílico
- MAPE o ASGM:** Minería Artesanal y a Pequeña Escala de oro
- METI-NITE:** Base de datos para el estudio de la bioconcentración y biodegradación de sustancias tóxicas
- MIP:** Polímero de impresión molecular
- MMA:** Ácido monometilarsónico
- MS:** Detector de masas
- MSHA:** Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo
- NIOSH:** Instituto nacional para la seguridad y salud ocupacional
- NOBE:** N,O-bis-metacriloil etanolamina
- OECD:** Organización para el Desarrollo y Co-operación Económica
- OSHA:** Conferencia americana de higienistas industriales
- PCs:** Fitoquelatinas
- PDMS:** Polidimetilsiloxano
- PNUMA:** Programa de las naciones unidas para el medio ambiente
- REACH:** Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas
- RfD:** Dosis de referencia
- RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- SEM:** Microscopía Electrónica de barrido
- SPE:** Extracción en Fase Sólida
- SPME:** Micro-Extracción en Fase Sólida
- TETRA:** Ión tetrametilarsonio
- TFIR:** Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier
- TGA:** Análisis termogravimétrico
- TMAH:** Hidróxido de tetrametilamonio
- TMAO:** Óxido de trimetilarsina
- USEPA:** Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
- WHO/OMS:** Organización Mundial de la Salud

FIGURAS

- 1.1 Clasificación de los agentes contaminantes
- 1.2 Estimación de las emisiones antropogénicas a nivel global y nacional
- 1.3 Ciclo biogeoquímico del mercurio (adaptación ref 13)
- 1.4 Biomagnificación a lo largo de la cadena trófica
- 1.5 Equilibrio necesario para la protección del medio ambiente
- 1.6 Compuestos de arsénico
- 1.7 Ciclo biogeoquímico del arsénico (adaptación ref 106)
- 1.8 Estimación del riesgo mundial de arsénico en agua potable
- 1.9 Distinción entre las fuentes de abastecimiento
- 1.10 Vías de exposición al Cd (adaptación de ref 140)
- 1.11 Clasificación de los nanomateriales en función del tamaño
- 1.12 Composición y tamaño de los QDs
- 1.13 Funcionalización de los QDs para su solubilización
- 1.14 Posibles rutas y transformaciones de los QDs en el interior celular
- 2.1 Tratamiento de muestra y técnicas de separación para la especiación de mercurio
- 2.2 Etapas para el desarrollo de la extracción en fase sólida
- 2.3 Esquema del dispositivo comercial de SPME comercializado por Supelco
- 2.4 Esquema del analizador directo de mercurio
- 2.5 Desarrollo modificado de la polimerización en partículas de sílice
- 2.6 Esquema modificado de la polimerización de injerto, A) aproximación "Grafting-to" y B) aproximación "Grafting-from"
- 3.1 Rutas principales de absorción y eliminación de sustancias químicas en peces para la estimación de BCF y BAF
- 3.2 Biomagnificación de una sustancia química en la cadena trófica
- 3.3 Organismos modelo típicos para estudios experimentales
- 3.4 Imagen de *Arabidopsis thaliana*

- 3.5 Principales líneas de investigación empleando *Arabidopsis thaliana*
- 3.6 Obtención de plantas transgénicas (adaptación ref 27)
- 3.7 Representación de mecanismos de desintoxicación de las PCs (adaptación ref 32)
- 3.8 Imagen del *Danio rerio*
- 3.9 Campo de investigación del pez cebra

TABLAS

- 1.1 Estimación de la ingesta diaria en $\mu\text{g}/\text{día}$ por la población no expuesta ocupacionalmente a mercurio
- 1.2 Comparación de las técnicas disponibles para la eliminación de arsénico en aguas contaminadas
- 2.1 Modelos matemáticos desarrollados para el cálculo de isothermas de adsorción
- 2.2 Materiales poliméricos para la determinación de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ por SPE
- 3.1 Comparación de los BCF teóricos y BCF experimentales

Resumen / Summary

RESUMEN

La contaminación medioambiental representa un problema de gran importancia en la actualidad. Estamos acostumbrados a escuchar por los medios de comunicación los numerosos casos que suceden a nuestro alrededor: la contaminación de ríos, lagos o playas por vertidos residuales; la contaminación de los suelos por utilización indebida de ciertos fertilizantes o por las actividades mineras de la zona; o la contaminación del aire ocasionada por el masivo número de automóviles y zonas industriales en las ciudades provocando las famosas “boinas” de las grandes ciudades. En el caso de los metales pesados o metaloides, pueden acumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica llegando a provocar efectos nocivos en los seres humanos.

Los contaminantes clásicos estudiados en esta tesis engloban el mercurio, arsénico, cadmio y plata. Entre todos ellos el mercurio y el arsénico son los que mayor repercusión medioambiental representan. El mercurio es un metal cuya toxicidad es muy elevada pero su repercusión en los efectos provocados en los seres vivos depende de la forma química en la que se encuentre en el medio. Las dos especies predominantes son mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y metilmercurio (CH_3Hg^+). El arsénico es un metaloide donde sus compuestos inorgánicos presentan mayor toxicidad. La contaminación de arsénico en agua y suelos supone un problema que afecta a millones de personas en Asia y en la zona Andina. El cadmio al igual que ocurre con el mercurio, es un elemento con gran tendencia a bioacumularse en la cadena trófica, estando relacionado con el cáncer de pulmón, próstata o renal. La exposición puede ser a través de la dieta o por inhalación de vapores; los fumadores incrementan esta exposición en un 50%. La plata es un elemento que encontramos en multitud de aplicaciones, principalmente en la energía solar, en el campo de la fotografía y en algunos medicamentos. Una exposición elevada provoca argiria en la piel u ojos. Existen otros contaminantes, los denominados emergentes, que son aquellos que debido a un aumento de las aplicaciones nanotecnológicas y del uso de nanopartículas, los podemos encontrar en el medio ambiente y sus efectos aún no están definidos, siendo actualmente objeto de estudio, como las nanopartículas de quantum dots (QDs), constituidas por seleniuro de cadmio principalmente. La toxicidad de estos QDs depende del recubrimiento de la nanopartícula, del tamaño y de la carga.

El trabajo presentado en esta tesis se ha centrado en el desarrollo de herramientas analíticas y estrategias para la determinación y estudio de acumulación de los elementos mencionados. Se presenta desde dos enfoques:

- Por un lado, se han desarrollado unos materiales poliméricos con alta selectividad hacia el mercurio y sus especies. Las aplicaciones de estos materiales dependen de la fortaleza de los enlaces establecidos entre el mercurio y sus especies y las cadenas del polímero. Las aplicaciones aquí recogidas se sitúan en el campo de la determinación analítica, que implica a las dos especies más encontradas en distintos tipos de muestras como alternativa a las técnicas cromatográficas, así como para la determinación ultrasensible en muestras con muy bajos contenidos en Hg. Sin embargo, y de cara a los siguientes estudios de investigación se podría plantear como filtros o membranas, para la retención de mercurio en zonas contaminadas, o como medida paliativa colocándose a la salida de los dispositivos de vertido.
- Por otro lado se han empleado organismos modelo vivos: *Arabidopsis thaliana* y *Danio rerio* (pez cebra), para estudiar el efecto que estos elementos provocan en los seres vivos e intentar comprender así los distintos mecanismos de desintoxicación o rutas de bioacumulación que se pueden producir. En el caso de *Arabidopsis thaliana* se han realizado estudios con plantas transgénicas para aumentar la tolerancia al arsénico y, de este modo, conseguir plantas hiperacumuladoras que captan el arsénico disponible del suelo haciéndolo más accesible para el cultivo. Los estudios llevados a cabo con larvas de *Danio rerio* han seguido un protocolo desarrollado en el grupo de investigación en tesis anteriores y se pretende presentar en un futuro como alternativa al Test 305 de la OCDE. Se trata de una exposición a los elementos mencionados, así como a los QDs, para posterior evaluación de una posible bioacumulación y explicar algunos de los efectos observados.

En resumen, los estudios recogidos en esta tesis abren la puerta a futuras aplicaciones para la remediación de zonas contaminadas por Hg y As, ya sea tras el uso de materiales poliméricos o la aplicación de plantas transgénicas. También se aporta una interesante alternativa para la especiación de mercurio sin necesidad de emplear técnicas cromatográficas tradicionales. Y por último el empleo de larvas de pez cebra nos ha servido de modelo para seguir aportando nuevos datos en la bioacumulación de distintos tipos de contaminantes.

SUMMARY

Currently the environmental pollution stands for a great importance problem. We are used to hearing by national and international media numerous cases that happen around us: contamination of rivers, lakes or beach by spill waste; soils contamination from improper use of fertilizers or mining activities; contamination of air due to massive motor vehicles use and the industrial areas. In the case of heavy metals and metalloid may accumulate and biomagnify through food chain getting to provoke harmful effect in humans.

Classical contaminants studied here include mercury, arsenic, cadmium and silver. Mercury and arsenic represent the most environmental impact. Mercury is a heavy metal whose toxicity is high, but its impact in humans depends on the chemical form that is found in the environment. The predominant mercury species are inorganic mercury (Hg^{2+}) and methylmercury (CH_3Hg^+). Arsenic is a metalloid of which its inorganic compounds are more toxic. Water and soil arsenic contamination suppose a problem which affects a million people in Asia and the Andean region. Cadmium, as mercury, trends to bioaccumulation through food chain. This accumulation is connected with lung, prostate and kidney cancer. Human exposition is due to diet or by inhalation of vapours; the smokers increase this exposition up to 50%. Silver is an element present in several applications, mostly in solar energy, photography and some medicines. High exposition provoke argyria in skin and eyes. In addition, there exist the emerging contaminants which presence in the environment has increased due to the development of new nanotechnologies applications and the nanoparticles. We can find the emerging contaminant in the environment but their effects are not well defined. This is the case of quantum dots (QDs) mainly formed of cadmium selenide. The QDs toxicity depends of nanoparticle covering, size and charge.

The work presented in this thesis has focused on the development of analytical tools and strategies for determining and studying accumulation of the elements previously described. It is presented from two approaches:

- On the one hand, polymeric materials have been developed with high selectivity towards mercury and mercury species. Their applications depend on the strength between mercury species and the polymer chains. The applications described in this thesis are focused on the analytical determination field, which involves the two mostly present mercury species as an alternative to chromatographic techniques, as well as ultrasensitive determination in samples with low mercury content. However, these materials could be considered as filters or membranes for mercury retention in contaminated areas, or palliative output systems of waste device in future investigations.

- On the other hand, organisms model as *Arabidopsis thaliana* and *Danio rerio* have been employed to study the effect that these elements provoke in the humans and understand the different detoxification mechanism or bioaccumulation pathways. In the case of *Arabidopsis thaliana* the research has been orientated to employ transgenic plants that can achieve high arsenic tolerance. In this way, hyperaccumulator plants capture available arsenic from the soil. The studies carried out with *Danio rerio* larvae have followed a protocol developed in our investigation group in previous thesis. This protocol aims at presenting in the future as alternative to Test 305 of OCDE. The strategy was based on an exposition to the elements previously cited and QDs evaluation of possible bioaccumulation and explain some observed effects.

In summary, the studies collected in this thesis open the door to future application for remediation of Hg and As contaminated areas by use of polymeric materials or transgenic plants. Besides it provides an attractive alternative for mercury speciation without using traditional chromatographic techniques. At the end, the zebra fish larvae as model, has allowed a valuable contribution of new bioaccumulation data of different types of contaminants.

Objetivos / Aims

OBJETIVOS

El trabajo de investigación desarrollado en esta tesis ha englobado el estudio de disciplinas diferentes entre sí, pero unidas por un objetivo común profundizar en el conocimiento y en las posibles soluciones a la contaminación ambiental. La elevada toxicidad de los metales pesados aquí estudiados ha generado la necesidad de establecer leyes más estrictas. Del mismo modo, la aparición de nuevos contaminantes emergentes, cuyos efectos en la actualidad, tanto en el ser humano como en el medio son un enigma, ha motivado su estudio en el medio a fin de establecer posibles pautas sobre su toxicidad. Una de los principales motivos de preocupación es su capacidad de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica.

Los objetivos de esta tesis pueden resumirse en:

- Síntesis de nuevos materiales poliméricos para la retención selectiva del mercurio. Desarrollo de nuevas configuraciones para el análisis de las especies de mercurio, mediante la búsqueda de métodos alternativos a las técnicas cromatográficas tradicionales.

- Obtención de plantas transgénicas hiperacumuladoras (*Arabidopsis thaliana*) de arsénico y estudio de los mecanismos relacionados con su acumulación y/o detoxificación.

- Análisis de los factores de bioconcentración de metales pesados y nanopartículas en larvas de pez cebra, utilizando un test alternativo al Test 305 de la OCDE desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación. Estudio de la distribución espacial en la larva a través de LA-ICP/MS.

AIMS

The research work developed and presented in this thesis includes different disciplines with the same goal, to understand and deep in the knowledge of environmental pollution. The heavy metals toxicity has contributed to establish stricter laws. On the other hand, the effects in humans of new emergent contaminants are an enigma and nowadays it seems necessary to know the possible toxicity pathways. One of the main concerns is the bioaccumulation and biomagnification capacity through the food chain.

The objectives of this thesis are summarized below:

- Synthesis of new polymeric materials for selective mercury retention; Development of new configurations for mercury species analysis through alternative methods to traditional chromatographic techniques.

- Attainment of hyperaccumulation transgenic plants (*Arabidopsis thaliana*) for arsenic to study mechanisms related with the arsenic accumulation and detoxification.

- Bioconcentration factors of heavy metals and nanoparticles in zebra fish larvae, using an alternative test to OCDE Test 305, previously developed in our research team. Spatial distribution by employing LA-ICP/MS technique.

Introducción

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

CAPITULO 1: CONTAMINANTES OBJETO DE ESTUDIO. DESCRIPTIVA Y PARTICULARIDADES

El desarrollo de la sociedad ha traído consigo la aparición de nuevos problemas de contaminación ambiental, origen de un estilo de vida fomentado por un elevado consumo, y con él una elevada producción de sustancias y materiales inexistentes en la naturaleza. Durante años, el estudio de contaminantes ha estado centrado en los agentes denominados “peligrosos o prioritarios”; dentro de este grupo están incluidos los metales pesados, pesticidas e hidrocarburos aromáticos, todos ellos contemplados en el ámbito legislativo y, por lo tanto, controlados¹. Existe un segundo grupo de compuestos, los llamados “candidatos”, a los cuales la población está expuesta; como ejemplos podemos citar el Bisfenol A y las dioxinas. Para poder determinar si estos compuestos deben pasar a la denominación de peligrosos, se están realizando seguimientos de evaluación de las concentraciones de exposición y de los daños asociados, como consecuencia de las evidencias de toxicidad encontradas. Los hábitos de consumo actuales son responsables de la aparición de nuevos residuos y contaminantes, de los que no tenemos información sobre su implicación e interacción con el medio ambiente; son los denominados “contaminantes emergentes”. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea (UE) los han definido como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por sus posibles consecuencias². Dentro de estos nuevos contaminantes, se encuentra una amplia gama de compuestos químicos como fármacos, agentes tensioactivos, plastificantes, aditivos industriales, nanomateriales, etc. Es importante señalar que, debido a su elevada producción no tienen por qué ser persistentes para ocasionar efectos negativos^{3,4}. Los tres tipos de contaminantes están resumidos en la Figura 1.1.

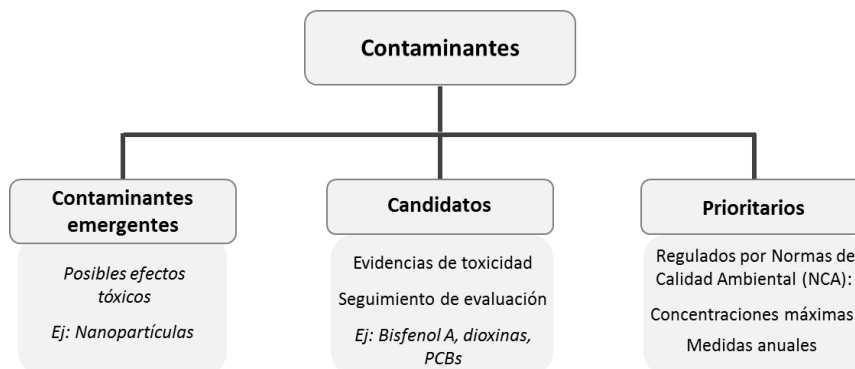


Figura 1.1: Clasificación de los agentes contaminantes²

El trabajo de investigación realizado en esta tesis se ha centrado en varios agentes prioritarios, o contaminantes clásicos y en el efecto de nanopartículas, como contaminantes emergentes, utilizando modelos vivos para determinar su bioconcentración, biotransformación y biodistribución. Los elementos objeto de estudio se presentan a continuación, describiendo con mayor detalle el Hg y a continuación el As, ya que han sido los elementos más estudiados en esta tesis.

CONTAMINANTES CLÁSICOS

1.1. MERCURIO

1.1.1. ANTECEDENTES

El mercurio (Hg) deriva de la palabra griega *Hydrargyros*, “agua plateada”; sin embargo, los romanos lo denominaron *Argentum Vivum*, “Plata viva”, debido a que era el único metal líquido a temperatura ambiente conocido hasta el momento⁵.

Antoine Laurent Lavoisier, considerado el *Padre de la Química*, fue el encargado de describir por primera vez el mercurio como elemento químico, tras la realización de sus experimentos sobre la composición del aire. Tras ellos, se definió su posición en la Tabla Periódica, ocupando la zona de los metales de transición y con nº atómico 80.

Las características físico-químicas más significativas se pueden resumir del siguiente modo. El mercurio elemental es un elemento blanco-plateado, inodoro y 13,5 veces más denso que el agua. Sus puntos de fusión y ebullición son respectivamente -38.38°C y 356.72°C . Posee una presión de vapor muy baja, 0.16 Pa, por lo que, en una atmósfera saturada a 20°C , la cantidad de mercurio contenida se aproxima a $15\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$. La mayoría del mercurio presente en la atmósfera se encuentra en su forma elemental. El mercurio consta de siete isótopos estables 196, 198, 199, 200, 201, 202 y 204 y de otros cuatro isótopos radioactivos inestables 194, 195, 197 y 203. Existen tres estados de oxidación: mercurio elemental (Hg^0), mercurioso (Hg_2^{+2}) y mercúrico (Hg^{+2}); dependiendo del estado químico en el que se encuentren sus propiedades varían. En el medio ambiente el mercurio nos lo encontramos, mayoritariamente, formando compuestos organomercúricos o sales inorgánicas.

Debido a estas características físico-químicas, el mercurio se convirtió en un componente importante en aplicaciones agrícolas, industriales y farmacéuticas. Las leyendas sobre los poderes mágicos que ofrecía el mercurio se extendieron hasta llegar al campo de la medicina, donde comenzó a utilizarse como tratamiento para la sífilis, y posteriormente para enfermedades oculares y sanguíneas⁶. Por otra parte, se comenzaron a detectar efectos del mercurio dañinos y, en algunos casos, letales

durante La Edad Media en los trabajadores de las minas de mercurio, y en personas que habían sido tratadas con remedios medicinales basados en este elemento. Es entonces cuando Paracelsus intentó explicar los efectos que este elemento podría ocasionar en el ser humano, determinándose de este modo, que el peligro radicaba en la aplicación directa externa y que la ingestión sería la vía más segura de suministro, ya que nuestro organismo lo eliminaría. El aumento de la ingesta de mercurio fue el origen de posibles daños en la salud, pues se empezó a tomar diluido en vino o leche⁷. En el siglo XIX surgió la expresión “loco como un sombrero”, como consecuencia del empleo de nitrato mercúrico por los fabricantes de sombreros, que lo inhalaban durante el proceso artesanal. A principios del siglo XX, tuvo lugar la llamada “enfermedad rosa” o acrodimia, manifestándose en mayor medida en niños, debido al empleo de pomadas con contenido en cloruro mercurioso^{8,9}. En los años 50 se produjo la primera gran intoxicación por mercurio en Minamata, Japón, donde durante años una factoría había estado vertiendo a la bahía grandes cantidades de mercurio, produciéndose intoxicaciones por CH_3Hg^+ a gran escala. Otra intoxicación significativa tuvo lugar en Irak, en la década de los 70, durante la llamada “Revolución verde”, debido a unas semillas de trigo tratadas con fungicidas basados en CH_3Hg^+ ¹⁰. De ambos casos, se hablará más adelante.

Este elemento se encuentra en la naturaleza principalmente en forma de cinabrio, explotado muy activamente por el ser humano durante siglos, siendo un ejemplo representativo las Minas de Almadén, en Ciudad Real. Otras fuentes antropogénicas importantes del mercurio son el uso en combustibles fósiles, la industria cloro-álcali y la obtención de productos farmacéuticos. Con el paso de los años se han producido modificaciones industriales y regulaciones más estrictas que han conseguido una reducción importante de sus emisiones. A pesar de ello, la cantidad de mercurio liberada en todas sus formas al medio ambiente sigue representando un riesgo importante para la salud, debido a su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica¹¹.

1.1.2. MERCURIO EN EL MEDIO AMBIENTE

El mercurio lo podemos encontrar en la Atmósfera, la Hidrosfera y la Geosfera, estableciéndose una distribución heterogénea entre ellas, mediante una serie de procesos físicos, químicos y biológicos. Las emisiones de mercurio al medio ambiente son de origen natural y antropogénico.

1.1.2.1. Ciclo natural del Hg

Este ciclo se genera a través de las fuentes naturales, como son las emisiones volcánicas, erosión, incendios forestales y procesos de desgasificación, debido a la sublimación que tiene lugar a temperatura ambiente. Estas emisiones pueden variar entre 2500 y 8200 toneladas al año dependiendo de la zona^{12,13}. La contribución de los océanos puede suponer hasta el 50 % del total de todas las emisiones producidas, mediante fenómenos de evaporación, tanto del mercurio depositado de forma natural como antropogénicamente^{13,14}. Se trata sobre todo de un ciclo atmosférico, donde una vez en el aire, puede ser inhalado directamente o incorporado a la cadena trófica^{15,16}.

1.1.2.2. Ciclo antropogénico

El ciclo natural del mercurio se ha ido potenciando con el paso de los años debido a las fuentes antropogénicas. Estimar el componente natural de la carga atmosférica es muy difícil, pero se han encontrado índices hasta 3 veces superiores desde la revolución industrial¹². Se han realizado estimaciones de las emisiones antropogénicas, situándolas en 2000-4500 toneladas al año. De todas ellas, un porcentaje muy elevado, 95 %, se deposita en la superficie terrestre, un 3 % en el agua y un 2 % permanece en el aire¹⁷⁻¹⁹. Las emisiones ocasionadas por el ser humano son directamente proporcionales al desarrollo industrial, surgiendo diferentes focos de emisión que dependen de la actividad realizada en la zona. Las emisiones a la atmósfera son en forma de mercurio elemental, representando hasta un 80 % del total. Estas emisiones son debidas principalmente a la quema de combustibles fósiles, a la minería e incineración de desechos. El suelo también recibe alrededor de un 15 % de mercurio, introducido mediante fertilizantes, fungicidas y vertidos domésticos; el último 5 % se incorpora al agua mediante los vertidos industriales, domésticos y agrícolas, estos últimos, a su vez provocan la contaminación de los suelos, donde la minería también juega un papel muy importante^{20,21}.

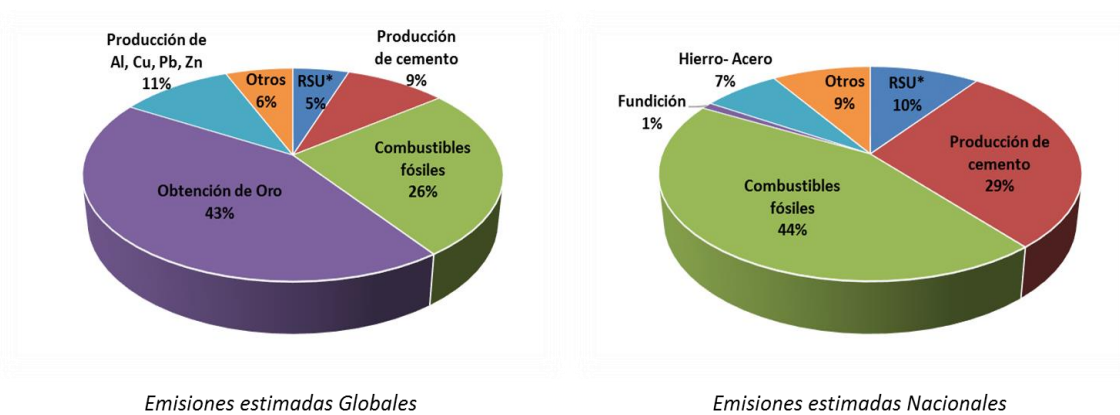


Figura 1.2: Estimación de las emisiones antropogénicas a nivel global y nacional^{22,23}
 (*RSU: residuos sólidos urbanos)

1.1.2.3. Ciclo Biogeoquímico

El mercurio es un elemento que está sometido a un flujo continuado a través de tierra, agua y aire. El flujo por estos compartimentos se debe a la multitud de reacciones que transforman el mercurio en sus diferentes formas químicas¹⁷. El resultado dependerá de las condiciones ambientales. La figura 1.3 muestra un esquema de dicho ciclo y los intercambios entre compartimentos ambientales.

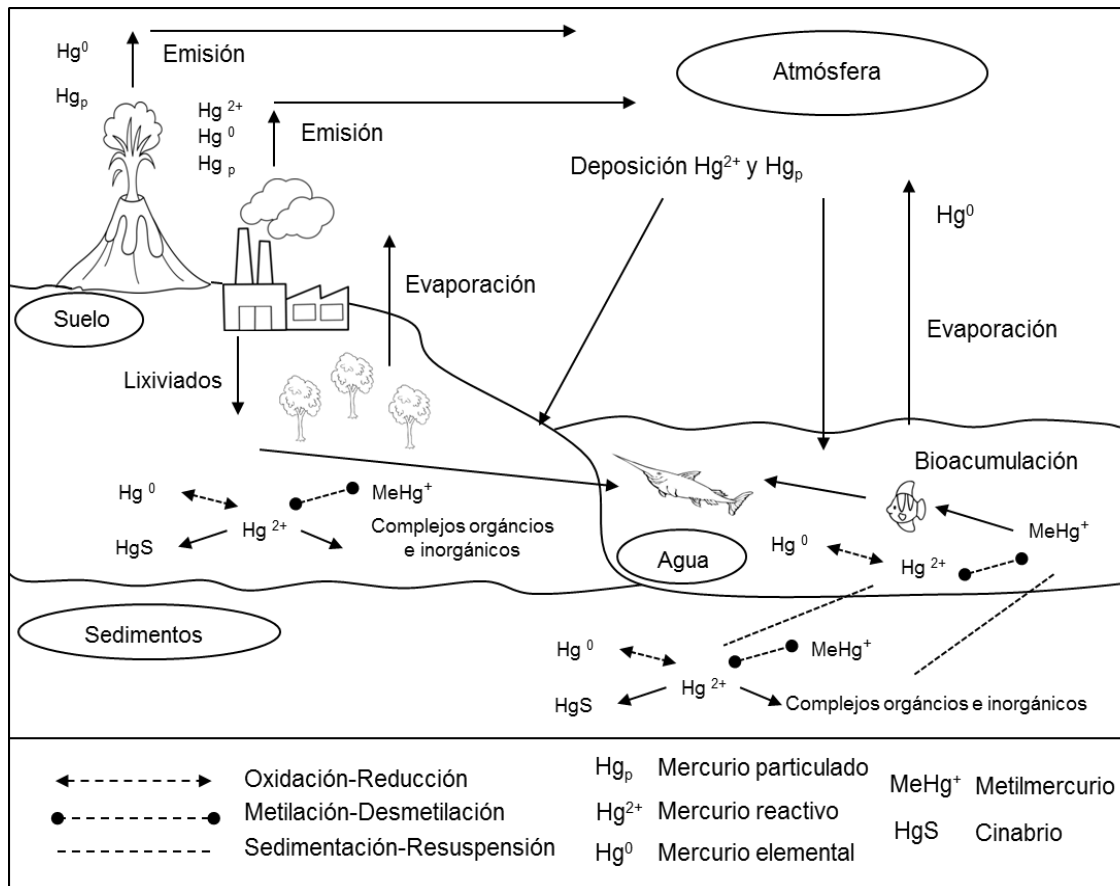
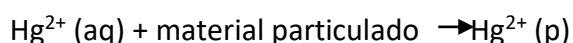
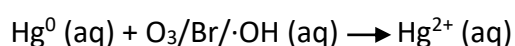
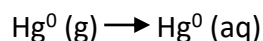


Figura 1.3: Ciclo biogeoquímico del mercurio (adaptación Ref 13)¹³

○ Mercurio en la atmósfera

Aproximadamente un 95 % del mercurio presente en el aire se encuentra en forma de Hg^0 (vapor metálico) y una pequeña parte como Hg^{2+} , presente en las partículas en suspensión. El vapor de mercurio es una especie muy estable, debido a su lenta oxidación, por este motivo puede circular libremente por la atmósfera entre 6 meses y 2 años. En todo ese tiempo puede recorrer grandes distancias y dispersarse a escala global antes de depositarse^{13,24}. El tiempo de vida del Hg^{2+} es menor, por lo que no puede desplazarse largas distancias, depositándose sobre la superficie (agua o tierra), mediante las precipitaciones. Esta forma química del mercurio es hasta 10^5 veces más soluble en agua que el Hg^0 .

Las reacciones que tienen lugar en la atmósfera provocan la transformación del mercurio en sus diferentes especies, que son distribuidas y depositadas a lo largo de la superficie que recorren. Dentro del conjunto de reacciones, cabe destacar el mecanismo de oxidación del Hg^0 por la acción del O_3 y del Br considerado actualmente como un oxidante muy importante, presente mayoritariamente en las nubes²⁵. Otras reacciones de oxidación y reducción son las debidas a los radicales libres que también se encuentran en la atmósfera, como los OH, HOCl/OCl⁻, NO₃⁻, pero son minoritarias^{20,26}.



- Mercurio en suelos

La concentración natural del mercurio en suelos y sedimentos es muy baja, situándose en intervalos de 0.01 a 0.2 mg/kg²⁷. En la década de los 80 los controles de emisión atmosférica permitieron obtener valores numéricos de estas emisiones, resultando un valor de 200.000 toneladas de mercurio emitidas²⁸, de las cuales aproximadamente un 95 % se han ido depositando en la superficie terrestre, convirtiéndose en una fuente de emisión constante a la atmósfera, debido a las numerosas reacciones que contribuyen a la transformación de Hg^{2+} a Hg^0 ¹³.

Una vez depositado en la superficie terrestre está sometido a multitud de reacciones biológicas y químicas, donde las condiciones de pH, temperatura y la materia orgánica pueden favorecer la aparición de complejos orgánicos e inorgánicos²⁹. El Hg^{2+} , como se ha mencionado anteriormente, tiene elevada solubilidad en agua, disponiendo de gran movilidad. Sin embargo, parte de los complejos se forman con la materia orgánica del suelo (ácidos fúlvicos y húmicos) y con las arcillas, limitando así su movilidad. El Hg^{2+} también puede ser “secuestrado” por aniones como los sulfuros, generando un compuesto altamente insoluble, HgS . Aun así, es la especie más biodisponible en suelos, pudiendo ser absorbida por las plantas a diferencia de lo que ocurre con el Hg^0 .

Por otro lado, los cambios de temperatura afectan en gran medida a los procesos de metilación del Hg^{2+} ; un incremento de la misma promueve las actividades microbianas, que son las encargadas de desencadenar la metilación del mercurio y al mismo tiempo de inhibir la desmetilación del CH_3Hg^+ ^{30,31}.

○ Mercurio en agua

El mercurio procedente del aire, tras viajar largas distancias y depositarse, bien por vía seca o húmeda en aguas oceánicas o dulces, lo hace mayoritariamente en forma de Hg^{2+} . Sólo una pequeña parte se deposita a través de las precipitaciones en forma de CH_3Hg^+ (0,15 ng/L). La concentración media de mercurio inorgánico en aguas superficiales no contaminadas es alrededor de 25 ng/L formando complejos con OH^- ($\text{Hg}(\text{OH})^+$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$) y con cloruros (HgCl^+ , HgClOH , HgCl_2), dependiendo de la concentración de cloruros presentes en el agua y de su pH ³². Las diferentes formas químicas del mercurio pueden ser asimiladas por las especies biológicas del medio, o sufrir una serie de reacciones de oxidación-reducción en función de las condiciones medioambientales, como la temperatura, el pH y la salinidad del agua, la cantidad de sulfuros o la actividad microbiana, promoviendo las diferentes transformaciones. Esta variabilidad medioambiental establece diferencias entre las aguas continentales o dulces y las aguas oceánicas. La mayor salinidad de los océanos puede inhibir el proceso de metilación del Hg^{2+} ^{13,31}. Una pequeña cantidad de Hg^{2+} es reducido a Hg^0 , el cual puede a su vez volatilizarse a la atmósfera. Al mismo tiempo una pequeña cantidad de Hg^{2+} puede convertirse tras procesos de metilación en CH_3Hg^+ , el cual puede bioconcentrarse en organismos vivos y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica. Este proceso de bioacumulación significa que las concentraciones encontradas de metilmercurio en depredadores acuáticos en relación a la cantidad hallada en agua puede diferir en un factor $\geq 10^6$ ³³. Las especies organomercuriales se generan a una profundidad de 300-500 m, donde los niveles de oxígeno son muy reducidos. En cambio, la transformación y eliminación de estas especies tiene lugar en las aguas superficiales. El mercurio puede también encontrarse como material particulado y coloidal en estas aguas ^{34,35}. Finalmente, se ha establecido que la concentración media de mercurio total en los océanos se puede aproximar a 1,5 pM ³⁶.

○ Cadena trófica

El ciclo del mercurio, potenciado por las actividades antropogénicas, tiene como consecuencia una incorporación a la cadena trófica. Se ha estimado que en el agua potable hay una concentración media de 25 ng/L, mayoritariamente en forma de mercurio inorgánico, mientras que en los alimentos, las concentraciones están en el rango de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y suele ser en forma de metilmercurio ³⁷.

La principal fuente de exposición de CH_3Hg^+ del hombre a través de los alimentos se debe al consumo de pescado. Los depredadores son capaces de bioconcentrar mercurio hasta concentraciones de 30-180 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Otra fuente importante de CH_3Hg^+ es el consumo de arroz, mayoritariamente en China. China es responsable del 29 % de arroz del consumo mundial. Las elevadas concentraciones de CH_3Hg^+ en estos cultivos se atribuyen a las óptimas condiciones que se generan para que las bacterias presentes

en el medio lleven a cabo las reacciones de metilación³⁸. El CH_3Hg^+ se absorbe mayoritariamente por las raíces, desde donde es transportado y distribuido por la planta. Algunos estudios han mostrado que la concentración encontrada en el grano del arroz ($17 \mu\text{g}/\text{kg}$) es superior a la hallada en otras partes de la planta, como las raíces ($7 \mu\text{g}/\text{kg}$)^{39,40}.

La figura 1.4 muestra el incremento de mercurio tras el ascenso a lo largo de la cadena alimentaria.

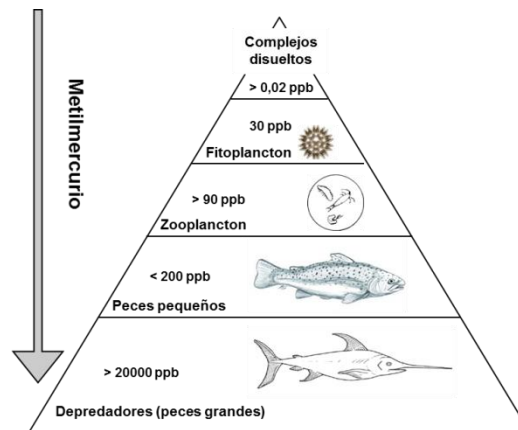


Figura 1.4: Biomagnificación a lo largo de la cadena trófica⁴¹.

1.1.3. TOXICIDAD DEL MERCURIO Y SUS ESPECIES

Ya han sido comentados algunos episodios puntuales de contaminación con resultados desastrosos para la salud pública, como los ocurridos en la Bahía de Minamata (Japón), o el caso de intoxicación en Irak. En la actualidad, el impacto clínico que provoca la exposición a mercurio continúa siendo motivo de discusión⁴².

La toxicidad depende de la forma química en la que se encuentre el mercurio y, por lo tanto, los síntomas varían según se trate de exposiciones a mercurio elemental, a compuestos inorgánicos u orgánicos. Estas especies pueden penetrar en nuestro organismo por tres vías: gastrointestinal, respiratoria y dérmica. La fuente de exposición es clave para determinar el tipo de especie a la que se está expuesto. La dieta es la principal fuente de exposición al mercurio inorgánico y orgánico, como el CH_3Hg^+ . Este último compuesto se encuentra principalmente en pescado y marisco, como ya se ha mencionado. Por otro lado, el contacto con mercurio elemental en la población se debe a las amalgamas dentales. En la última década, las investigaciones se han centrado en revisar las concentraciones mínimas donde comienzan a generarse efectos tóxicos, siendo más bajas de lo estimado. Los resultados de estos estudios

agravaron la situación a nivel global, ya que la población está más expuesta de lo que se pensaba⁴³.

En la tabla 1.1 se resumen las cantidades de mercurio en sus diferentes formas químicas, a las que está expuesta la población.

MEDIO DE EXPOSICIÓN	INGESTA DIARIA Y RETENCIÓN (µg/día)		
	Elemental	Inorgánico	CH ₃ Hg ⁺
Aire en zonas urbanas	0.04-0.2 (0.03-0.16)	---	0.008 (0.007)
Amalgamas dentales	1.2-27 (1-21.6)	---	---
Pescados	---	0.6 (0.06)*	2.4 (2.3)*
Otros alimentos	---	3.6 (0.36)	---
Agua potable	---	0.05 (0.005)	---

* suponiendo un consumo de pescado de 100g/semana

Tabla 1.1: Estimación de la ingesta diaria en µg/día por la población no expuesta ocupacionalmente al mercurio⁴⁴. (la cantidad estimada retenida en el cuerpo de un adulto aparece entre paréntesis)

1.1.3.1. Mercurio elemental

La principal vía de exposición es por inhalación; aproximadamente un 80 % es absorbido por los pulmones, debido a su volatilidad a temperatura ambiente⁴³. El resto, alrededor de un 10 % se incorpora a nuestro organismo mediante ingestión, o a través de la piel⁴⁵. Una vez absorbido se distribuye rápidamente tras atravesar las membranas celulares, llegando a la sangre, cerebro e incluso la placenta. El tiempo de vida media que puede permanecer en nuestro organismo es de 60 días⁴⁴. Los efectos tóxicos se deben a la gran afinidad que presenta el vapor de mercurio hacia los grupos sulfhidrilos, uniéndose a ellos en aminoácidos y proteínas, transportándose de este modo a todas las partes del organismo. Otros efectos derivados del mercurio elemental es su rápida oxidación a Hg²⁺ en presencia de oxígeno o su posible metilación, mediante la actividad de microorganismos^{46,47}.

Los síntomas más comunes tras largas exposiciones a mercurio elemental son temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de la memoria, cambios en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza. También se pueden detectar efectos en el riñón y en el tiroides, y las altas exposiciones pueden ocasionar incluso la muerte³⁷.

Su eliminación del organismo se produce mayoritariamente excretado por la orina, pero también puede liberarse en pequeña cantidad por el sudor o la saliva.

1.1.3.2. Mercurio inorgánico

Las sales de mercurio se han podido encontrar en preparados medicinales, como cremas antisépticas o blanqueantes. Existen dos tipos de sales, las mercúricas (Hg^{2+}) y las mercuriosas (Hg_2^{2+}), éstas últimas en forma de calomelanos (Hg_2Cl_2). Los calomelanos son poco solubles en agua y su absorción en el organismo es muy baja⁴³. Por el contrario, las sales mercúricas, como el HgCl_2 , pueden producir efectos muy significativos debido a su elevada solubilidad en agua. Su absorción a través de la piel es de un 10 %, pasando después al tracto digestivo⁴⁷. Al igual que ocurría con el vapor de mercurio, estas sales cuando penetran al torrente sanguíneo se adhieren a los grupos azufre de los eritrocitos, de la metionina o se quedan suspendidos en el plasma⁴⁸. Aunque no pueden atravesar la membrana para llegar al cerebro, se puede acumular de forma cuantitativa en la placenta^{43,49}.

Los síntomas que se han detectado en personas expuestas a las sales mercúricas, fueron daños en los riñones y en el sistema gastrointestinal. El daño renal es el resultado de la acumulación que se produce en estas zonas. Si las exposiciones son más continuadas, los fallos renales pueden llegar a ocasionar la muerte.

Se ha estimado que la vida media efectiva es de 42 días, para un 80 % del mercurio absorbido, el 20 % restante no se puede constatar con fiabilidad, ya que puede estar involucrado en procesos de desmetilación o en otros mecanismos aún no muy claros. La eliminación se realiza mayoritariamente mediante la orina o heces^{43,45}.

1.1.3.3. Mercurio orgánico

Los compuestos orgánicos se pueden agrupar fundamentalmente en alquilvercurio y fenilvercurio. Dentro del grupo de los alquilvercurio podemos encontrar los compuestos etilvercurio y metilvercurio, ambos de toxicidad similar; el metilvercurio es el más importante, ya que mucha población está expuesta a él debido al consumo de pescado, principalmente. Este compuesto es rápidamente absorbido después de la ingestión, inhalación o contacto con la piel. El 100 % de la cantidad ingerida es absorbida a través del tracto digestivo⁵⁰. La mayor parte pasa al torrente sanguíneo, donde puede unirse a la membrana y a la hemoglobina, donde es oxidado a Hg^{2+} . Cuando llega a la sangre, se distribuye rápidamente por todo el organismo, pero donde se acumula en mayor medida es en el cerebro, riñones, hígado, placenta y llegar al feto

debido a su elevada solubilidad lipídica. Desde que se ingiere hasta que se distribuye por todo el organismo alcanzando el equilibrio, pasan 4 días, pero el tiempo de vida medio que permanece en él es de 70 días. Su eliminación se puede realizar por acetilación o conjugación con la cisteína, pero el 90 % se excreta mediante las heces⁴³.

En el caso de los compuestos de fenilmercurio, entre el 80%-100% se absorbe por el tracto digestivo o por la piel; la gran diferencia respecto al metilmercurio, es su rápida eliminación por la orina. Su toxicidad se asemeja a la de las sales mercurícas.

Los síntomas más precoces por intoxicación no son específicos, ya que se manifiestan como un malestar general y visión borrosa. Si la exposición va aumentando, puede generar la pérdida de visión, sordera, ataxia e incluso la muerte, ya que se ve afectado el sistema nervioso central de forma irreversible.

1.1.4. ¿CÓMO Y DÓNDE SE PRODUCE LA EXPOSICIÓN AL MERCURIO?

La población está expuesta al mercurio por distintas vías que dependen, en su mayoría, de la ocupación profesional y del tipo de alimentación de cada individuo. Otras posibilidades de exposición con menor repercusión, son las debidas a determinadas prácticas médicas u odontológicas y al uso de ciertos medicamentos.

1.1.4.1. Exposición ocupacional

Este tipo de exposición tiene lugar en todos los ambientes de trabajo donde el mercurio forme parte de algún proceso. La inhalación de los vapores de mercurio suele ser la vía mayoritaria de intoxicación⁵¹. Dependiendo de la actividad desarrollada y los tiempos de exposición, los efectos que se pueden observar van desde leves síntomas, a grandes desórdenes que pueden llegar a causar la muerte.

Los ambientes laborales donde la exposición a mercurio puede generar mayores desajustes son: las minas de mercurio, en los procesos de extracción de plata y oro, las plantas cloro-álcali, las industrias relacionadas con la manufacturación y/o uso de instrumentos que contengan mercurio⁵². En todos ellos, el límite biológico por exposición ocupacional no debe superar los 10 ng/mL de mercurio en sangre⁵³.

En España la explotación de mercurio ha tenido gran repercusión a lo largo de la historia, localizándose principalmente en las Minas de Almadén, Ciudad Real. No se sabe con exactitud cuándo empezaron las labores mineras, pudiendo remontarse a la época de los fenicios. Pero no fue hasta el siglo XVIII cuando apareció un primer escrito, "Catástrofe morbosa de las Minas Mercuriales de la Villa de Almadén", informando sobre las enfermedades de los mineros⁵⁴. En los años 90 la explotación minera fue disminuyendo, cesando completamente su actividad en el año 2001, y en el 2003 la metalurgia primaria de mercurio. Sin embargo, no fue hasta el 2011 cuando se

prohibió la comercialización de mercurio metálico, con la entrada en vigor del Real Decreto 1102/2008 el 15 de Marzo⁵⁵.

Otro tipo de minería donde el mercurio juega un papel importante es en la minería artesanal y a pequeña escala de oro (MAPE o ASGM). Los mineros utilizan el mercurio para amalgamar y así extraer el oro, separando el mercurio del metal precioso posteriormente por calentamiento. Realizar una estimación de la amplitud de los daños ocasionados por este proceso es un desafío, ya que se trata de una práctica muy dispersa y a veces no regulada⁵⁶. En el año 2013 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) organizó el primer Foro Andino sobre ASGM, con objeto de plantear los principales retos para reducir el uso del mercurio, desarrollar estrategias políticas para su formalización y promover la cooperación regional y el intercambio de información⁵⁷.

Las plantas de cloro-álcali constituyen también un foco de emisiones de mercurio en el ambiente de trabajo. En España existen 9 plantas, siendo la más antigua la de Fix, en Tarragona, comenzando su funcionamiento en 1899. La producción de sosa cáustica se realiza en celdas electrolíticas que utilizan un cátodo de mercurio. En el cátodo se forma una amalgama con los iones de sodio, que al mezclarse con el agua, reaccionan formando NaOH e H₂, liberando el mercurio para su reutilización. Algunos estudios han intentado demostrar que durante este proceso pueden ocurrir pequeñas fugas de mercurio, en el producto o en la corriente de agua⁵⁸⁻⁶⁰.

1.1.4.2. Exposición Alimentaria

Como ya hemos ido viendo en anteriores epígrafes, la mayoría de la población está expuesta principalmente a través de los alimentos. Un factor muy importante es la capacidad del mercurio para acumularse en los organismos y del mismo modo biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica. Como ya se ha descrito, la especie por excelencia que se absorbe y se acumula mayoritariamente es el metilmercurio⁶¹.

Los alimentos que pueden ser fuente de exposición a mercurio son sobre todo pescados pero también carnes, aves, cereales y el agua. En la gran mayoría de los alimentos, el contenido de mercurio es inferior o igual a 20 µg Hg por Kg de producto fresco. La especie predominante tanto en peces, como en mamíferos, es el CH₃Hg⁺, entre un 70-90 %. Su lenta eliminación genera un enriquecimiento de esta especie, en comparación al mercurio inorgánico. Este hecho se verifica en los niveles tróficos superiores. La cantidad de mercurio que se encuentra disponible en tejidos comestibles varía entre 0.05-1.4 mg de Hg por Kg de peso fresco⁶². Esta concentración puede variar en función de factores ambientales como el pH o la temperatura, o en función de la especie de pescado, tamaño y edad. Las concentraciones de mercurio en los niveles más bajos de la cadena, como por ejemplo, en las anchoas es de 0.085 mg/kg. Sin embargo, en el caso de los depredadores, los niveles pueden superar los 1.2

mg/kg⁶³. El uso de harinas de pescado como alimento de aves de corral y de otros animales destinados al consumo humano, también contribuye al aumento en los niveles de mercurio. Un estudio realizado en Alemania, encontró en las aves de corral una concentración de mercurio entre 0.03-0.04 mg/Kg de mercurio³⁷. También se observó que en la leche y carne, procedente del ganado bovino, podían encontrarse trazas de mercurio. El límite establecido para los pescados es de 0.5-1 mg/kg en peso húmedo. Debido a la dificultad para estimar una ingesta diaria de estos alimentos, se ha establecido una dosis de referencia (RfD), que es la cantidad de metilmercurio, que tomada diariamente y durante un período continuado de tiempo, se considera que no tiene efectos adversos para la salud del ser humano. A igual o inferior concentración al RfD, no se esperan efectos nocivos⁶⁴. Actualmente se ha establecido este índice en 0.1 µg/kg/día, de modo que la ingesta tolerable semanal es de 1.6 µg/kg. Pero estudios posteriores⁶⁵ han aconsejado bajar esos límites un 25 % hasta los 0.025 µg/kg/día.

1.1.4.3. Exposición Iatrógena

Este tipo de exposición se debe al uso de derivados del mercurio como remedios medicinales. Aunque a día de hoy se sabe que la contribución que ejerce este tipo de exposición al contenido total de mercurio en nuestro organismo es despreciable, se considera de interés por las consecuencias que tuvieron para una pequeña parte de la población.

Uno de los fármacos que generan aún bastante controversia, es el uso de timerosal en las vacunas a niños. Las vacunas que contienen timerosal son: contra la difteria, el tétanos y la tosferina, la hepatitis B, la rabia, la gripe y las infecciones por *Haemophilus influenzae* de tipo b y meningococos⁶⁶. El timerosal, también conocido como mercuriotiolato o 2-(etilmercuriotio) benzoato de sodio, se administra como antiséptico y preservante desde 1930. Una vez en nuestro organismo se disocia dando lugar a compuestos liposolubles. Generalmente, el contenido de la concentración de timerosal como conservante en estas vacunas varía entre 8-50 µg por dosis, como: DwPT (Triple antígeno) 25 µg Hg/dosis de vacuna, Hepatitis B (Recomvax B[®]) 12,5 Hg µg/dosis de vacuna y Agrippal S1[®] 50 µg. Además, algunas vacunas pueden contener cantidades ínfimas de timerosal (< 0,5 µg por dosis)⁶⁷. Se han realizado estudios, donde se estableció una relación directa entre la administración de estas vacunas y el incremento de casos de niños diagnosticados con autismo. En el año 2004, la Academia Americana de Pediatría (AAP) y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU, manifestaron su preocupación ante una posible epidemia, tras el aumento de casos de autismo. Se observó que desde la década de los 40, hasta el 2004 el incremento había sido exponencial, correspondiéndose con el comienzo del uso de estas vacunas⁶⁸⁻⁷⁰.

La OMS ha redactado recientemente un informe con la GACVS (Global Advisory Committee on Vaccine Safety) manifestando que en la actualidad no hay una evidencia clara de la toxicidad neurológica derivada de estas vacunas y que las evidencias que apoyan esta hipótesis son sólo teóricas⁷¹. A pesar de ello, la FDA trabaja con los fabricantes para reducir y/o eliminar el timerosal en las vacunas de niños hasta 6 años.

Por otro lado, en los últimos años el uso de las amalgamas dentales de mercurio, ha suscitado grandes controversias como posible medio de exposición iatrogénico. Estas amalgamas se utilizan como material de relleno en odontología desde hace 150 años, aproximadamente. Su contenido en Hg varía entre un 45-55 %, exponiendo a la población a los vapores de mercurio metálico. En el año 2008 tuvo lugar una sentencia que denominaron “histórica”, por la cual la FDA debía clasificar las obturaciones dentales de amalgama de mercurio, como un material potencialmente peligroso, pudiendo ocasionar efectos neurotóxicos en los sistemas nerviosos de niños y fetos⁴². Se han realizado numerosos estudios para ratificar el vínculo entre este tipo de lesiones y las amalgamas dentales, pero las evidencias encontradas no han sido concluyentes. A pesar de ello, la FDA informó que las personas con muchos empastes, su exposición a mercurio podría superar la ingesta semanal tolerable^{72,73}. En la Convención de Minamata celebrada en el año 2013 aparece un apartado referido específicamente a las amalgamas dentales. Esta aparición supuso un reconocimiento internacional de los daños que estos materiales pueden provocar en el ser humano, fomentándose a nivel internacional la disminución gradual del empleo de Hg en las amalgamas dentales^{74,75}.

1.1.4.4. Exposición accidental aguda

Uno de los casos más importantes en la historia por intoxicación aguda debida al metilmercurio, fue el ocurrido en Minamata, Japón, en la década de los 50 y 60. Una fábrica que empleaba mercurio como catalizador para la obtención de acetaldehído y cloruro de vinilo, vertía sus aguas residuales a la bahía, que contenían tanto mercurio inorgánico, como metilmercurio⁷⁶. El CH_3Hg^+ se fue bioacumulando en el medio acuático, ascendiendo en la cadena trófica. Esto originó una intoxicación generalizada, a la que se denominó enfermedad de Minanata⁷⁷. En el año 1956 fue diagnosticada por primera vez, pero no fue hasta el año 1959 cuando se determinó su procedencia. La población estuvo sometida a niveles de exposición elevados, sufriendo alteraciones neurológicas graves en adultos, pero la peor parte se la llevaron los fetos, cuyas madres acumulaban altas dosis de mercurio. Estos bebés al nacer podían padecer parálisis cerebral severa, ceguera y retraso motor^{78,79}. A pesar de las primeras evidencias se continuó vertiendo residuos hasta el año 1968, cuando el gobierno japonés comenzó a tomar medidas, levantando un muro de acero y hormigón para separar la bahía en dos. Todos los sedimentos fuera de la bahía que superasen los

8.75mg/kg eran dragados y bombeados a la parte interior, para ser enterrados bajo tierra virgen. Este proceso garantizó que al menos el 50 % de la cantidad de mercurio emitida fue estabilizada, prohibiendo la pesca en la zona hasta los años 90^{79,80}.

Otros usos del mercurio han sido en su aplicación como fungicidas y plaguicidas. En la agricultura, se utilizaban para el tratamiento de semillas, y para controlar el crecimiento de las algas y microorganismos; en plantas de papel, como blanqueante; en pinturas para barcos, como aditivos. Todos estos productos contenían compuestos orgánicos de mercurio⁸¹. La aplicación de mercurio como fungicida fue la culpable, de uno de los mayores desastres por contaminación química, ocurrido en Irak en la década de los 70. La población consumió trigo tratado con un fungicida con contenido en metilmercurio, para la conservación de las cosechas. Muchas personas murieron y alrededor de 100.00 sufrieron daños cerebrales graves⁸². Desde este acontecimiento, el uso de biocidas, que contuviesen CH_3Hg^+ fueron prohibidos¹⁰.

1.1.5. TENDENCIAS HACIA EL DESARROLLO SOSTENIBLE

En la actualidad, se busca el equilibrio entre las emisiones producidas y las recibidas del medio que nos rodea, en otras palabras, se quiere alcanzar un desarrollo sostenible entre la humanidad y el medio ambiente. Según las Naciones Unidas, el desarrollo sostenible se define como “la satisfacción de las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras, para satisfacer sus propias necesidades”⁸³. Este concepto, ha surgido para el desarrollo mundial a largo plazo, y consta de tres pilares fundamentales para alcanzar el equilibrio entre el desarrollo económico, el desarrollo social y la protección del medio ambiente.



Figura 1.5: Equilibrio necesario para la protección del medio ambiente.

Una de las herramientas para llevar a cabo esta idea de sostenibilidad es la elaboración de “La Valoración del Ciclo de la Vida” (Life Cycle Assessment), que estudia los posibles impactos que ocasionan la manufacturación y consumo de productos, desarrollando métodos para reducir estos impactos en el medioambiente. Los criterios que se tienen en cuenta son tres⁶²:

- Realizar un balance con las entradas y salidas dentro del marco de la producción.
- Evaluación de los posibles impactos asociados al balance anterior.
- Interpretación de los resultados y valoración del impacto.

En este contexto global, la preocupación sobre el mercurio unió fronteras, publicándose la primera evaluación mundial sobre el mercurio y sus compuestos en el año 2002, con la participación del Consejo de Administración del PNUMA y en colaboración con otros miembros del Programa Interinstitucional para la Gestión Racional de las Sustancias Químicas, donde se acordó una mayor participación internacional para reducir los riesgos sobre la salud y el medio ambiente. Las primeras medidas que se establecieron para hacer frente a los problemas adversos fueron^{37,84}:

A- Reducir las emisiones de mercurio a la atmósfera

Mediante el establecimiento de valores máximos de emisión de dióxido de azufre de las grandes instalaciones de combustión en el rango comunitario, concediendo compensaciones económicas a aquellas industrias que proporcionen información sobre las emisiones y las técnicas de prevención y control.

B- Reducir la circulación de mercurio, restringiendo la *Oferta* y la *Demanda*

La principal medida focalizada en la restricción de la *oferta* fue la disminución progresiva de la producción primaria de mercurio, hasta la eliminación total de las exportaciones en el año 2011. Respecto a la *demanda*, la industria cloro-álcali, las pilas y la extracción de oro, supone un 75 % del consumo mundial. La industria cloro-álcali está en el punto de mira de la UE, no considerando el empleo de las células de mercurio como mejor técnica disponible y su eliminación progresiva está latente⁸⁵. Respecto al empleo de mercurio en pilas existe la Directiva 91/157/CEE, que limita su uso⁸⁶.

C- Resolver los problemas con los *excedentes* y los *depósitos* de mercurio

La prohibición de las exportaciones de mercurio conlleva al planteamiento de almacenamiento o eliminación de los excedentes. El almacenamiento definitivo sería una solución óptima, pero llevarla a cabo sería muy costosa e incierta técnicamente. Por este motivo, se han focalizado las investigaciones en la búsqueda de almacenamientos viables en cuanto a eficacia-coste. En relación a los residuos, las

normas comunitarias dan prioridad a su recuperación, antes que proceder a la eliminación. En los últimos años, se ha incrementado el número de estudios centrados en la recuperación de zonas contaminadas. Dentro de los sistemas ambientales, el suelo es el medio más estático y en consecuencia, los contaminantes pueden permanecer durante más tiempo en él. Esta permanencia y acumulación ha sido objeto de estudio, permitiendo el desarrollo de diferentes técnicas de recuperación de suelos, diseñadas para aislar o destruir las sustancias contaminantes, alterando su estructura química mediante procesos químicos, físicos o biológicos. Su aplicación depende de las características del suelo y del contaminante, de la eficacia esperada con el tratamiento, la viabilidad económica y el tiempo para llevarse a cabo^{87,88}.

Las *técnicas tradicionales*, son tecnologías utilizadas a gran escala, necesitando un desarrollo de ingeniería civil. Estas prácticas constituyen procesos físicos, químicos y térmicos que requieren en algunos casos retirar físicamente el suelo de su emplazamiento^{89,90}. El problema de estos métodos son los costos tan elevados que presentan, y en algunos casos la modificación de las características del suelo. Debido a esto, surgió la necesidad de buscar nuevas tecnologías que fuesen ecológicamente responsables y de menor coste. Como respuesta surgió la *biorremediación*, como alternativa a los métodos tradicionales. En el caso del mercurio, la estrategia de biorremediación consiste en cuatro procesos: i) rizofiltración, para la remediación de ambientes acuáticos⁹⁰⁻⁹³; ii) fitoestabilización, empleado para estabilizar el mercurio del suelo; iii) fitovolatilización, donde se extrae el mercurio del suelo y su posterior liberación a la atmósfera por volatilización; iv) fitoextracción, el mercurio tras su absorción, se transloca a los tejidos aéreos, siendo allí donde se acumulan.

D- Proteger de la exposición a mercurio

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), manifestó el riesgo de la presencia de mercurio en personas que consumen muchos productos relacionados con la pesca, pudiendo alcanzar o rebasar los niveles de seguridad establecidos. Por ello, hay que reducir los límites máximos en los productos de pesca fijados por el reglamento 466/2001 (CE), o normalizar unas recomendaciones destinadas a grupos concretos de consumidores, como las mujeres embarazadas y los niños⁹⁴.

E- Mejorar la comprensión de la problemática del mercurio

El desconocimiento sobre la problemática del mercurio y de las posibles soluciones pueden solventarse mediante proyectos de investigación, donde se enfatice en los efectos que provoca el mercurio en la salud del ser humano, y estudiando tanto las formas de acumulación en el medioambiente, como los efectos encontrados en los ecosistemas. Para ello, deben establecerse los canales de emisión, residuos y productos con contenido en mercurio, para desarrollar técnicas que permitan el tratamiento, estabilización, reducción y almacenamiento.

F- Apoyar y fomentar las iniciativas internacionales

Para llevar a cabo estas medidas es primordial que el problema de mercurio sea tratado a escala mundial. La reducción de las emisiones en los sectores de la energía, los metales, el cemento y la industria cloro-álcali, se ha realizado mediante la aplicación de técnicas alternativas disponibles, que han permitido reducir significativamente las emisiones. La UE considera que puede reducirse la cantidad de mercurio hasta el 2020, si continúa la sustitución de los métodos de trabajo en estos sectores.

Estas medidas representaron el primer paso para la aplicación de soluciones coherentes a nivel comunitario a la problemática global del mercurio. Al mismo tiempo, se presentaron propuestas legislativas para llevar a cabo los objetivos propuestos. Pero no ha sido hasta el 2013, cuando la ONU aprueba el primer tratado para controlar las emisiones de mercurio, involucrando a los países miembros. Este acuerdo se llamó "Convención de Minamata sobre el Mercurio", en memoria a la catástrofe ocurrida en Japón, y ha sido firmado por 93 países²³. Las medidas incluidas en este Convenio para controlar las emisiones y liberaciones de mercurio son: a) Medidas para controlar el suministro y comercialización prohibiendo la extracción primaria de Hg y eliminando las minas existentes; b) Medidas de control de productos con Hg, cuya producción quedará prohibida en el 2020 (baterías, interruptores, lámparas fluorescentes, cosméticos, termómetros); c) Medidas de control industrial, por ejemplo, en las plantas de cloro-álcali y de acetaldehído, donde ya hay fechas establecidas para eliminar el Hg en el proceso de fabricación (2025 y 2018, respectivamente); d) Medidas de control en la obtención y extracción de oro artesanal; e) medidas sobre almacenamiento provisional de Hg y sobre sitios contaminados; f) medidas para la protección e información de la población en situación de riesgo aumentando la asistencia médica y formación de los profesionales de la salud.

1.2. ARSÉNICO

1.2.1. ANTECEDENTES

El arsénico ha sido utilizado como veneno a lo largo de la historia, ya que sus síntomas podían confundirse con los del cólera, utilizándose en todo tipo de conspiraciones desde la Edad Media hasta el Renacimiento. Uno de los envenenamientos más famosos se remonta a la familia Borgia, que utilizaron As contra los cardenales de la época para aumentar su poder en Italia⁹⁵. Otra víctima fue Napoleón Bonaparte, que a pesar de las sospechas de que padeciera un cáncer estomacal, la concentración de As hallada en su cabello postuló la hipótesis de una exposición a As mediante fármacos o cosméticos⁹⁶.

Exactamente no se puede datar la fecha de su descubrimiento, pero en el año 4000 a. C. ya se utilizaba en la elaboración de los primeros bronce, llegando a las civilizaciones a través de sustancias o compuestos que contenían arsénico. Su color amarillo favorecía la conversión de metales en oro, entrando en el campo de la alquimia como medio para la elaboración de la píldora de la inmortalidad⁹⁷.

Por su posición en la tabla periódica, es un elemento denominado metaloide o semimetal. Este emplazamiento le otorga unas propiedades intermedias entre los metales y los no metales. Es de color gris o amarillo, de número atómico 33 y su masa atómica 74,92. En la naturaleza, lo podemos encontrar en cuatro estados de oxidación: elemental As (0), dos trivalentes, As (III), As (-III) y pentavalente As (V). Sus compuestos pueden ser orgánicos e inorgánicos. Los compuestos inorgánicos están presentes en el medio en forma de oxoaniones en disolución, como el arsenito y arseniato, y en fase sólida como óxidos, cloruros o sulfuros. Los compuestos orgánicos están formados por sus especies metiladas, el ácido monometilarsónico (MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA), el óxido de trimetilarsina (TMAO) y el tetrametilarsonio (TETRA), o formando compuestos orgánicos más complejos, como arsenocolina (AsC), arsenobetaína (AsB), arsenoazúcares, arsenolípidos y compuestos de base proteica, como metalotioneínas o fitoquelatinas.

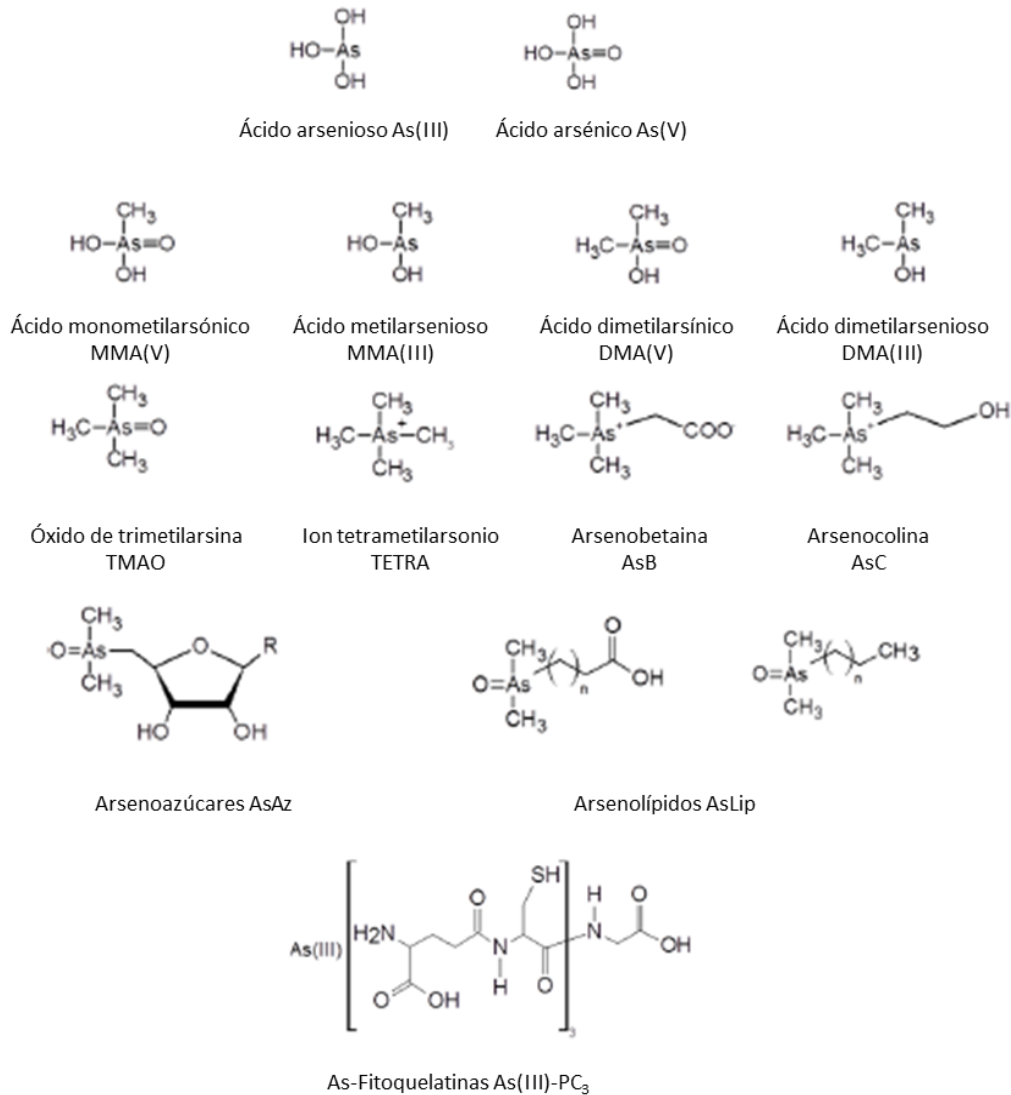


Figura 1.6: Compuestos de arsénico⁹⁸

1.2.2. ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE

El arsénico se distribuye en la corteza terrestre, encontrándose en todos los compartimentos: suelo, aire y agua. La concentración de As en el medio está relacionada directamente con las actividades antropogénicas desarrolladas en el lugar como la minería, efluentes industriales, pesticidas y el riego con aguas contaminadas⁹⁹. El 60 % del arsénico lo encontramos en las rocas en forma de arseniato (AsO_4^{3-}), un 20% como sulfuros o sales de azufre y el resto como arsenito, óxidos o arsénico elemental. Los minerales más comunes son la arsenopirita (FeAsS), el rejalar (AsS) y el oropimente (As_2S_3). Los niveles de arsénico presentes en la atmósfera se deben a procesos de erosión, emisiones volcánicas, incendios forestales y procesos de volatilización de arsénico que tienen lugar como resultado de procesos biológicos como la biometilación ^{98,100}.

El arsénico liberado al medio ambiente mediante actividades antropogénicas proviene de una amplia variedad de actividades humanas: minería y fundiciones, fabricación de productos farmacéuticos, quema de combustibles fósiles, como conservante para la madera, fabricación del vidrio, pesticidas, fungicidas, industria electrónica, entre otras⁹⁹. En la agricultura ha sido ampliamente utilizado, un ejemplo es el arsenito de sodio, fungicida para proteger las vides, que dejó de utilizarse en el año 2001¹⁰¹. La contaminación atmosférica proviene mayoritariamente de los combustibles fósiles, debido a la formación del óxido de arsénico (As_2O_3), reteniéndose en la atmósfera y sedimentando después en forma de polvo o mediante las precipitaciones¹⁰².

Las zonas del planeta más expuestas a los altos niveles de arsénico en aguas y en consecuencia en alimentación es en Asia; en la India y Bangladesh los niveles hallados en el agua son de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ de As, superando en 5 veces los niveles recomendados por la Organización Mundial de la Salud, establecidos en 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ ¹⁰³. En general, se estima que existen más de 70 países en los que el agua de consumo presenta niveles de arsénico por encima de lo permitido^{99,100}. A pesar de este hecho, en la mayoría de los países no se alcanza el nivel máximo permitido para los productos de consumo, aunque la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la OMS recomiendan no superar una ingesta diaria de 150 μg de As inorgánico para un adulto de 70 kg de peso¹⁰³.

1.2.2.1. Ciclo biogeoquímico

El ciclo biogeoquímico del arsénico involucra una serie de transformaciones que tienen lugar en el agua, suelo, plantas y animales, donde los microorganismos juegan un papel importante. En el caso de las plantas y animales se realiza una transferencia medio-planta y/o medio-animal produciéndose procesos de bioacumulación. Las principales transformaciones de arsénico mediada por los microorganismos incluyen: oxidación, reducción, metilación y desmetilación. Los resultados de estas reacciones son diferentes formas químicas del arsénico, con distinta movilidad en el medio $\text{MMA(III)} \gg \text{MMA(V)} > \text{As(III)} > \text{As(V)}$, que verá afectada la absorción mediante la interacción suelo-planta, en función de la biodisponibilidad de las mismas¹⁰⁴.

En los ambientes marinos el arseniato (AsO_4^{-3}) es transformado por el fitoplancton, moluscos, peces y algas a arsenito (AsO_3^{-3}), que puede sufrir reacciones de reducción o metilación obteniendo MMA, DMA, H_3As , ésta última fácilmente excretada al medio por su elevada volatilidad. Por otro lado, algunas algas pueden formar arsenoazúcares, compuestos solubles en agua y arsenolípidos, que son transformados en AsB. El ciclo marino se completa con la degradación de la AsB por los microorganismos de los sedimentos costeros, obteniendo MMA y arsénico inorgánico^{100,104,105}.

En suelos nos podemos encontrar las formas inorgánicas del arsénico. Si los suelos son aerobios, la especie predominante es el arseniato, mientras que el arsenito solo se

encuentra en ambientes reducidos. La metilación de estos compuestos dan lugar a MMA, DMA y en menor proporción TMAO¹⁰⁵.

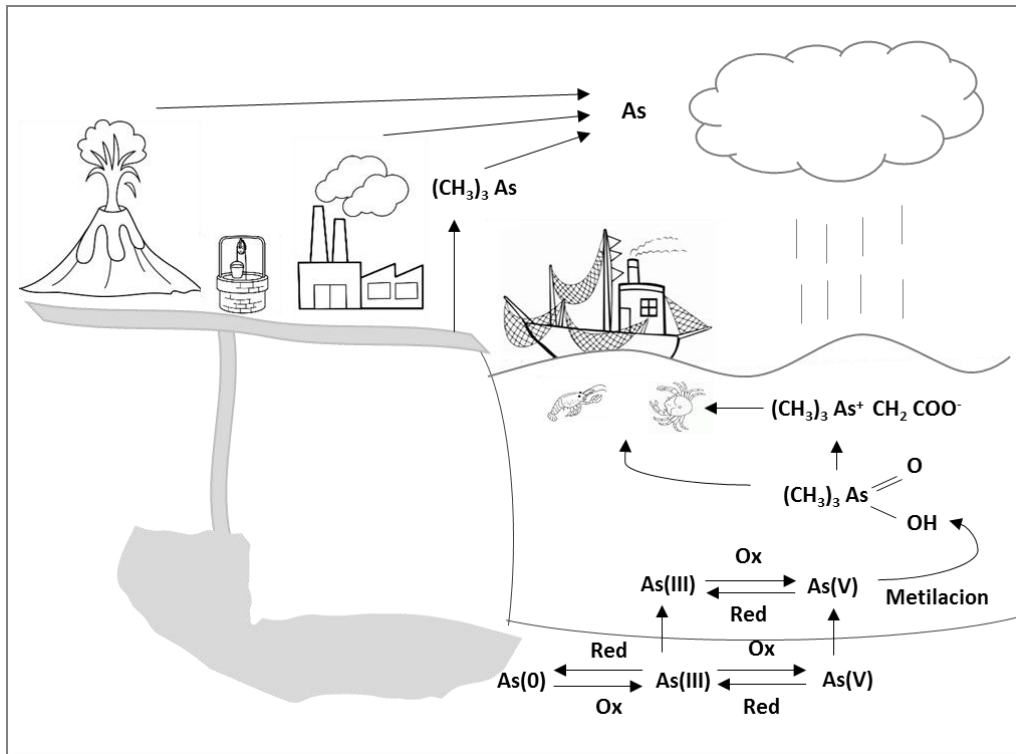


Figura 1.7: Ciclo biogeoquímico del arsénico (adaptación ref 106)¹⁰⁶

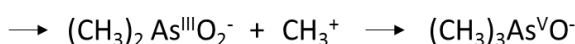
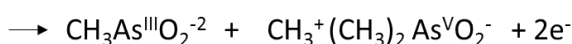
1.2.3. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO Y SUS ESPECIES

La toxicidad de este elemento depende de su forma química y del estado de oxidación, siendo los compuestos inorgánicos más tóxicos⁹⁵: $As(III) > As(V) > MMA \approx DMA$. mientras que la AsB y AsC no se consideran tóxicas. Debido a esta toxicidad se ha estudiado el efecto de las especies inorgánicas del arsénico en la salud humana. La Agencia internacional para la investigación sobre el Cáncer (IARC) lo ha clasificado como cancerígeno¹⁰⁷.

Las principales vías de entrada al organismo son a través del agua y de los alimentos. Debido a la biomagnificación a lo largo de la cadena trófica, pueden causar problemas en la salud y provocar efectos adversos. En los humanos los efectos tóxicos producidos por el arsénico se conocen como *arsenicosis*¹⁰⁸, que depende de la cantidad de arsénico ingerida. Las exposiciones se pueden catalogar como agudas o crónicas. Las agudas se refieren a una exposición elevada de arsénico en un período corto de tiempo y la exposición crónica se produce a bajas concentraciones, pero durante largos periodos de tiempo. En el caso de exposiciones agudas se puede producir la muerte en pocas horas, debido a su rápida absorción; sin embargo, una exposición crónica conlleva un desmejoramiento progresivo que puede llevar hasta la muerte. Los

síntomas por envenenamiento se pueden confundir con otras enfermedades, por lo que su diagnóstico suele ser tardío; pueden ir desde lesiones de la piel hasta cuadros clínicos graves de los sistemas gastrointestinal, circulatorio periférico y nervioso^{95,109,110}.

Una vez absorbido el arsénico se distribuye a través del torrente sanguíneo, llegando a los distintos tejidos y órganos, acumulándose en uñas, pelo y piel. La mayoría de este arsénico se transforma en especies menos tóxicas y es excretado a través de la orina.



Los compuestos orgánicos se excretan sin necesidad de transformaciones previas, siendo las especies inorgánicas las excretadas tras los procesos de metilación. En la orina podemos encontrar mayoritariamente DMA (60-70 %), y en menor cantidad arsénico inorgánico (10-30 %) y MMA (10-20 %), siendo el DMA un buen marcador para comprobar la exposición a arsénico¹¹¹.

La entrada del arsénico a la célula depende del estado de oxidación, siendo el AsO_4^{-3} quien está más favorecido, debido a su similitud al PO_4^{-3} , compartiendo los mismos transportadores, pudiendo sustituir a grupos fosfatos en reacciones enzimáticas. De este modo, se interfiere en la transferencia de fosfato a la adenosina difosfato (ADP) para formar la adenosina trifosfato (ATP), privando a la célula de la energía necesaria para realizar sus funciones. Una vez dentro, se puede reducir a As (III) por la acción de la arsenoreductasa u otras enzimas y expulsarse mediante unos transportadores intrínsecos. Otra ruta de eliminación es la utilizada por el PO_4^{-3} ^{112,113}. Por otro lado, el As (III) interviene en las funciones enzimáticas y en procesos de transcripción celular, debido a su afinidad hacia los grupos sulfhidrilo (-SH), presentes las proteínas y en enzimas ricas en residuos de cisteína. Así tiene lugar la desnaturalización de las proteínas y enzimas, llegando a provocar la muerte celular debido el estrés oxidativo que inhibe la acción de la GSH reductasa, disminuyendo la protección ante los oxidantes^{110,114-116}.

1.2.4. ¿CÓMO Y DÓNDE SE PRODUCE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO?

Las principales vías de exposición al arsénico para la población en general son la dieta, y la exposición ocupacional, aunque ésta última no tiene gran repercusión a nivel global, siendo por tanto la cadena alimentaria la principal vía. Además de estas vías, existe población que vive en zonas con elevadas concentraciones de arsénico de la que también vamos a hablar aquí.

1.2.4.1. Exposición alimentaria

El estudio del arsénico en alimentos se ha focalizado en la caracterización de sus especies, ya que está presente en muchos alimentos pero dependiendo de la especie mayoritaria puede resultar tóxico o inocuo.

Los productos de pesca son los que mayor concentración de arsénico contienen. Las concentraciones pueden alcanzar 1 µg/g peso húmedo, superando en ocasiones los 10µg/g¹¹⁷. La Arsenobetaina, inocua, representa más del 80 % del contenido de As total presente en pescados, mientras que la concentración de arsénico inorgánico suele ser inferior a 0,2 µg/g^{118,119}. Los productos de origen animal terrestre contienen generalmente una concentración total de arsénico inferior a 0.5 µg/g¹²⁰. En plantas las concentraciones no son elevadas, a excepción del arroz, en el cual podemos encontrar concentraciones tanto de arsénico total como de arsénico inorgánico muy superiores a las de los otros cereales¹²¹. El arroz es una planta bioacumuladora de las especies inorgánicas de arsénico, implicada en procesos de desintoxicación, siendo capaces de transformar el arseniato en otras especies con menor toxicidad. La concentración en el grano de arroz en zonas no contaminadas oscila entre 5-250 µg/kg¹²²; mientras en lugares contaminados los valores medios encontrados varían entre 0.2-2 mg/kg¹²³.

1.2.4.2. Exposición ocupacional

Como ya se ha mencionado anteriormente, este tipo de exposición es baja, siendo su repercusión mínima frente a la exposición global. La exposición ocupacional procede de las fundiciones y refinerías, siendo la metalurgia del cobre la principal fuente de exposición¹²⁴.

1.2.4.3. Exposición en zonas con elevada concentración

Algunos estudios han identificado áreas en diferentes partes del planeta con contenidos de arsénico en agua potable superiores a los 50 µg/L, siendo la India, Bangladesh, Tailandia, Argentina, Chile, EE.UU y Canadá los países más afectados¹²⁵.

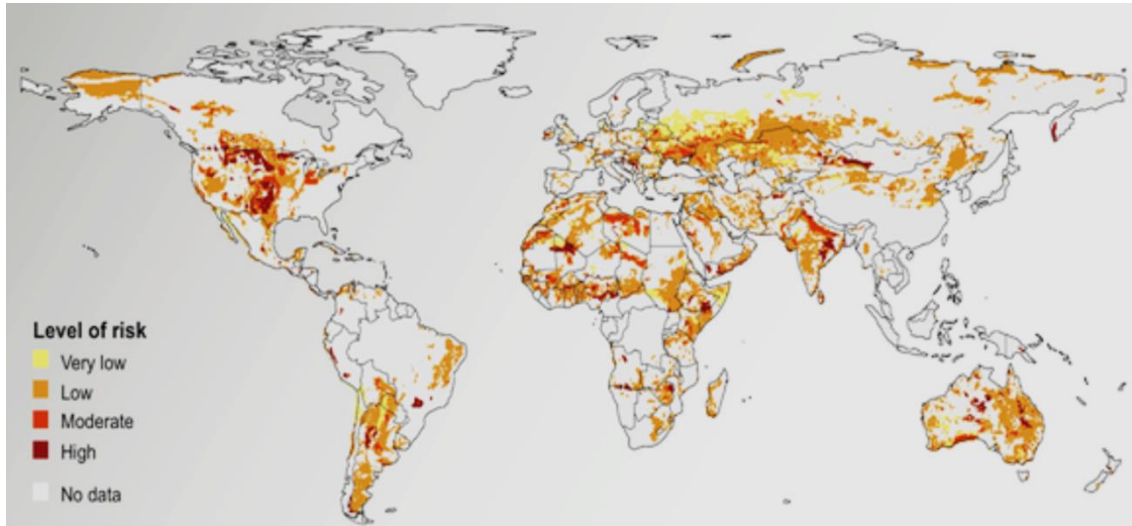


Figura 1.8: Estimación del riesgo mundial de arsénico en agua potable¹²⁶

La India y Bangladesh son los países con el mayor número de intoxicaciones por arsénico del mundo. Los primeros casos por arsenicosis detectados en la población fueron a partir de la década de los 80; desde entonces, se han realizado numerosos estudios en los acuíferos para determinar el área afectada, evidenciando que la contaminación podría llegar hasta Nepal. Teniendo en cuenta la amplitud del área, así como su elevada población, esta exposición se puede traducir en 36 millones de personas afectadas y 150 millones en riesgo, y se ha descrito como el mayor envenenamiento masivo en la historia^{127,128}. El agua subterránea se utiliza para el riego de cultivos de arroz en Bangladesh, estos cultivos ocupan el 83 % de la superficie total dedicada al cultivo en general. Los niveles de arsénico encontrados en estos suelos varía entre 4-8 mg/kg ¹²⁹.

Otra zona muy afectada por el arsénico es el área andina y, en concreto, el norte de Chile. Los chilenos han estado expuestos a elevados niveles de arsénico en el agua. Entre los años 1958-1970 las concentraciones halladas en algunas aguas fueron de hasta de 850 µg/L, disminuyendo progresivamente tras la aplicación de diferentes tratamientos hasta los 40 µg/L en 1995 ¹³⁰. La relación causal entre la ingesta de arsénico por vía digestiva y el cáncer alcanzó altos valores en el año 1994¹³¹.

La búsqueda del origen del arsénico en estos acuíferos hace postular al desarrollo de un ambiente reductor y a la presencia de materia orgánica. El conjunto de estas condiciones originan la desorción del arsénico contenido en las rocas. Por tanto, se trata de una fuente natural y no antropogénica¹³².

1.2.5. TENDENCIAS HACIA EL DESARROLLO SOSTENIBLE

En la misma línea que se ha mostrado para el Hg, se describen aquí algunas de las actuaciones propuestas a nivel mundial para paliar la contaminación originada por arsénico, especialmente en los lugares más afectados.

La OMS estableció en el año 2003 unas pautas para prevenir y controlar las comunidades más afectadas por la contaminación de los acuíferos, implantando un sistema más seguro de abastecimiento de agua potable y de riego. Se plantearon distintas opciones¹³³:

- En primer lugar, señalar de forma diferente las fuentes de abastecimiento. De color rojo las fuentes con altos contenidos de As, y en color verde las fuentes de bajo contenido para poner en conocimiento de la población los acuíferos más contaminados y evitar su uso.



Figura 1.9: Distinción entre fuentes de abastecimiento¹³⁴

- Sustitución de fuentes de abastecimiento con elevados niveles de arsénico mediante el empleo de agua de lluvia o aguas superficiales debidamente tratadas como agua de consumo y riego. Las aguas subterráneas se limitarían al aseo y limpieza.
- Cuando sea posible, mezclar ambas fuentes de abastecimiento, con el fin de conseguir aguas con niveles aceptables.
- Instalación de sistemas de eliminación de As, a nivel centralizado o doméstico, asegurando así un tratamiento residual adecuado, como puede observarse en la tabla 1.2

TECNOLOGÍA	EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN AS(III)	EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN AS(V)	COSTE RELATIVO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Coagulación/ Coprecipitación	< 20%	> 90%	Bajo	No requiere monitorización Bajo cote Reactivos fácil de obtener	Obtención de lodos tóxicos Operarios expertos
Coagulación con hierro	60% - 90%	> 90%	Bajo	Bajo coste Buena eficiencia Reactivos fácil de obtener	Require una preoxidación
Coagulación mejorada	60% - 90%	> 90%	Bajo-Medio	Elevada eliminación de arsénico, como de materia orgánica.	Técnica emergente no disponible a gran escala
Alúmina activada	60% - 90%	> 90%	Medio	Reactivos de bajo coste	Obtención de lodos tóxicos
Sorbentes basados en hierro (IBS)	30% - 60%	> 90%	Bajo-Medio	Elevadas posibilidades	Control de pH reemplazo del medio para asegurar las condiciones de operación
Osmosis inversa	60% - 90%	> 90%	Alto	No residuos sólidos Eliminación de otros contaminantes No necesita agentes químicos	Elevados costes Mantenimiento Reajuste de la calidad del agua
Nanofiltración	60% - 90%	> 90%	alto	Elevada eliminación	Costes elevados

Tabla 1.2: Comparación de las técnicas disponibles para eliminación de As de aguas contaminadas¹²⁶

1.3. CADMIO

1.3.1. ANTECEDENTES

El cadmio deriva del latín “cadmia” que significa calamina, nombre que recibía antiguamente el carbonato de zinc. Fue descubierto por Friedrich Stromeyer en 1817, tras observar el cambio de color que experimentaba al calentar algunas muestras de calamina. Hoy se sabe que la calamina es un hidroxisilicato de zinc y que contiene trazas de óxido de cadmio. El cadmio es un metal pesado que no se encuentra en la naturaleza en estado puro, sino asociado por afinidad química al zinc, plomo y cobre. El mineral más abundante de cadmio es la Greenockita (sulfuro de cadmio). Este elemento aislado presenta un color gris azulado metálico, con 48 de número atómico y masa atómica de 112,40. Existen 8 isótopos estables y se han descrito 11 isótopos radioactivos inestables artificiales. El estado de oxidación es +2 (Cd^{2+}), pudiendo formar complejos: óxido de cadmio (CdO); cloruro de cadmio ($CdCl_2$); sulfato de cadmio ($CdSO_4$)¹³⁵. Es uno de los elementos considerados más tóxicos, pues es persistente en el medioambiente y tiende a bioacumularse, de manera similar a lo que ocurría con el Hg.

1.3.2. CADMIO EN EL MEDIO AMBIENTE

La presencia del cadmio en la naturaleza se debe a emisiones naturales, como las erupciones volcánicas y la erosión de rocas y minerales. El cadmio está asociado como ya se ha dicho antes principalmente con minerales de zinc, en una proporción de 3:1000 (Cd:Zn).

Las emisiones debidas a las actividades antropogénicas se pueden dividir en dos: emisiones industriales y emisiones como consecuencia de la contaminación urbana. Las primeras engloban la minería, fabricación de fertilizantes fosfatados, incineración de residuos de madera, carbón o plásticos, procedente de la galvanotecnia, donde es muy empleado en la fabricación de electrodos negativos de baterías de níquel-cadmio. Las emisiones debidas a la contaminación urbana son la incineración de residuos sólidos urbanos (RSU) y calefacciones. Estas actividades industriales han incrementado las emisiones de Cd al medioambiente¹³⁶.

1.3.2.1. Ciclo Biogeoquímico

Si se compara la concentración de cadmio encontrada en la atmósfera de zonas industriales con atmósferas de zonas rurales, las cantidades varían desde los 10-30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, en zonas industriales, a los 6 ng/m^3 de las rurales¹³⁶. El cadmio llega al suelo por distintas vías: un 40 % mediante deposición, un 54 % con el uso de fertilizantes fosfatados y en menor cantidad un 5 % por el estiércol¹³⁷. En medios acuáticos, la presencia del Cd depende de la concentración de las sales disueltas. En aguas con baja salinidad, podemos encontrar el Cd en su forma libre, Cd^{2+} , o formando complejos hidroxilados $[\text{Cd}(\text{OH})_2]$. En medios de mayor salinidad, la presencia de cloruros favorece la formación de complejos como CdCl_2 y CdCl^+ , disminuyendo la disponibilidad de cadmio libre. Los organismos acuáticos absorben el Cd^{2+} , por lo que en aguas con alta concentración de sales, la bioacumulación disminuye respecto a medios dulces. En el suelo, lo podemos encontrar tanto como ion libre o formando complejos con distintos aniones $[\text{CdCl}^+ \text{CdSO}_4]$, siendo los fertilizantes fosfatados los principales responsables de su presencia. Por estas dos vías se inicia la acumulación a lo largo de la cadena trófica, a través de los animales y las plantas^{138,139}.

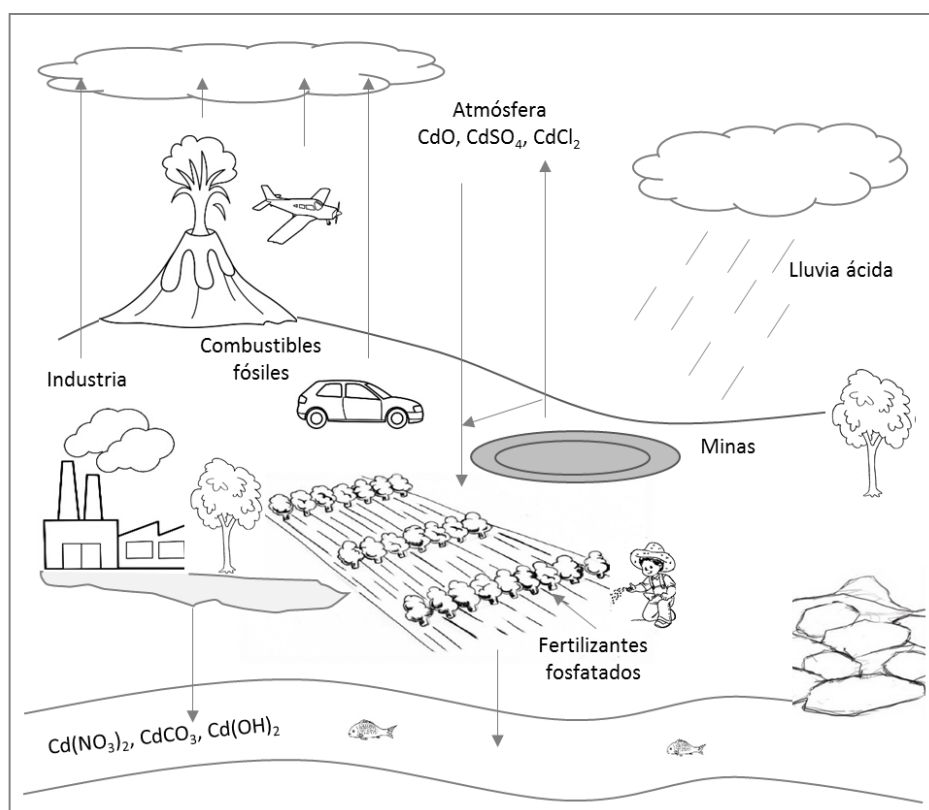


Figura 1.10: Vías de exposición al Cd (adaptación de ref. 140)¹⁴⁰

1.3.3. TOXICIDAD DEL CADMIO

La absorción, distribución y excreción del cadmio en el ser humano depende de la solubilidad y biodisponibilidad de la fuente de entrada. La incorporación del cadmio a las células puede deberse a transportes pasivos o mediante canales activos, como los canales de calcio; ya en el interior pueden formar complejos estables mediante su unión a proteínas con bajo peso molecular con grupos SH libres, presentando gran afinidad por la metalotioneína. Estas proteínas se caracterizan por tener gran cantidad de residuos de cisteína, que le otorgan una gran capacidad para formar complejos con metales pesados, como el Cd^{141,142}. El cadmio en la sangre se une a estas proteínas, siendo su medio de transporte hasta el hígado y de ahí a otros órganos, como los riñones, donde se une muy establemente a la corteza renal, acumulándose durante larguísimos períodos de tiempo, hasta 20-30 años¹⁴³. Lo más habitual es la eliminación del cadmio absorbido mayoritariamente a través de la orina, y en menor medida con la bilis, el sudor o el pelo.

En 2007 la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) lo catalogó entre los materiales más peligrosos para el medioambiente. En el 2009 la

EFSA estableció unas medidas preventivas para disminuir la concentración de Cd en el medio ambiente de las que hablaremos más adelante y, de este modo, conseguir su disminución en la transferencia a la cadena trófica¹³⁷. La bioacumulación del cadmio en el organismo puede perturbar los niveles de calcio, zinc o hierro, involucrados en funciones celulares básicas, ocasionando problemas como hipertensión, desórdenes neurológicos, y problemas en el sistema endocrino^{143,144}.

1.3.4. ¿CÓMO Y DÓNDE SE PRODUCE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO?

La población está expuesta al Cd como en los casos anteriores por dos causas principales, la exposición alimentaria y la ocupacional¹³⁷:

1.3.4.1. Exposición alimentaria

La principal vía de introducción al organismo es la alimentaria, mayoritariamente tras la ingestión de cereales, productos a base de cereales, hortalizas, frutos secos, legumbres, y en menor medida las frutas y algunos pescados como el bonito, sardina o atún, pudiendo contener entre 50-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Cd¹⁴⁵. La UE fijó unos valores recomendados de ingesta semanal de 2.5 μg Cd por kg de masa corporal. El agua contribuye en menor medida al aporte de cadmio dentro del organismo, con un valor máximo de 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ para que sea apto su consumo¹⁴⁶. El Cd se concentra en la plantas rápidamente y de forma más significativa en las hojas, disminuyendo su concentración en frutos y semillas. En el medio marino, la acumulación del Cd en pescados va desde niveles insignificantes para la trucha, o los mejillones, hasta niveles elevados en fitoplancton^{147,148}. Además, hay que tener en cuenta un factor más de contaminación, la población fumadora, los cuales pueden absorber cantidades comparables con la ingestión alimentaria ya que inhalan de 0,1 a 0,2 μg de Cd por cigarrillo, con una absorción aproximada del 50 %. Esto supone para un fumador de 20 cigarrillos diarios dos veces la carga corporal de un no fumador¹⁴⁹.

1.3.4.2. Exposición ocupacional

Los trabajadores de la industria metalúrgica de cadmio y de plomo-zinc, de producción de pigmentos, de estabilizadores de plásticos y en la fabricación de baterías de Cd-Ni pueden acumular niveles elevados de cadmio dependiendo de la función que desempeñen. Lo más habitual es la inhalación de humos y vapores o la ingesta de óxido de cadmio. Los efectos que provoca van desde leves irritaciones en piel y en el aparato respiratorio, enfermedades cardiovasculares y renales, hasta poder desarrollar cáncer de pulmón, próstata o renal^{150,151}.

1.3.5 TENDENCIAS HACIA EL DESARROLLO SOSTENIBLE

Debido a que toda la población está expuesta al cadmio a través de distintos medios: alimentación, baterías o pinturas, se han redactado un nuevos Reglamentos con el objetivo de plantear algunas recomendaciones y líneas de actuación para reducir la exposición al Cd. En el caso de los alimentos, la normativa UE 488/2014 recomienda^{152,153}:

- Se precisa de una información más detallada sobre la ingesta de alimentos en la población, para poder realizar un cálculo más preciso. Estos datos servirían para evaluar el potencial de alcance del cadmio en los diferentes grupos poblacionales.
- Se ha elaborado un listado de los alimentos con mayor contribución a la exposición al cadmio, principalmente por su elevado consumo: cereales y productos a base de cereales, hortalizas, frutos secos y legumbres, patatas y productos cárnicos. Por otro lado, se han detectado mayores concentraciones de Cd en algas marinas, el pescado y los mariscos, las setas, las semillas oleaginosas y los despojos comestibles.
- Se han modificado los contenidos máximos de cadmio en alimentos, donde se incluyen los cereales, pescados, carnes, hortalizas, despojos y los complementos alimenticios. Además, se están añadiendo productos nuevos a la lista, como el cacao y el chocolate, consumidos mayoritariamente por niños.
- Es necesario establecer un contenido máximo en preparados para lactantes y productos de continuación infantiles contribuyen a la exposición en lactantes y niños. Estos preparados se obtienen a partir de proteínas de soja o mezcla de proteínas de leche de vaca que pueden contener niveles superiores a otros productos lácteos. La soja es una alternativa para lactantes intolerantes a la lactosa, pero la soja puede absorber el cadmio del suelo. Por ello, es necesario establecer unos valores máximos en los productos a base de soja. Por otro lado, los alimentos elaborados a base de cereales y otros alimentos infantiles constituyen una importante fuente de exposición para este grupo poblacional.
- Se estable un plazo de actuación hasta el 2018 a los Estados miembros para que impulsen políticas de mitigación de la presencia de Cd en explotaciones agrícolas e industrias alimentarias.

Por otro lado, en el año 2013 la normativa 2013/56/UE ¹⁵⁴, y recientemente el Real Decreto 710/2015 ¹⁵⁵, establecen las pautas a seguir para la eliminación de pilas,

acumuladores y baterías que superen el 0.002% de Cd en peso del mercado, estableciendo la recogida anual de sus residuos, fijando el objetivo de un 98% a partir del 31 de Diciembre de 2018. Respecto al contenido de Cd en las pinturas, en el año 2006 el Reglamento UE 1907/2006¹⁵⁶ prohibió el uso de cadmio y compuestos del cadmio en pinturas a excepción de las pinturas a base de cinc. El contenido de Cd se ha visto reducido con el nuevo Reglamento 2016/217 estableciendo¹⁵⁷:

- No se utilizarán ni comercializarán pinturas en una concentración igual o superior al 0,01 % en peso de Cd.
- En el caso de pinturas, que además contengan niveles de cinc superiores al 10 % en peso de pintura, la concentración de cadmio no será igual o superior al 0,1 % en peso.
- No se comercializarán artículos pintados si la concentración de cadmio es igual o superior al 0,1 % en peso de la pintura aplicada en el artículo pintado.

1.4. PLATA

1.4.1. ANTECEDENTES

La plata, del latín *argentum*, es un metal blanco-grisáceo que ocupa en la tabla periódica la posición 47 y tiene 107.8 de masa atómica. Sus excepcionales propiedades físicas y químicas han originado un amplio uso durante miles de años. Ya se menciona en el libro del Génesis y se postula que ya se separaba del plomo en Asia hace 4.000 años, utilizándose para joyería, cubiertos, vasos, etc. Hipócrates “padre de la medicina” ya conocía y aplicaba la plata como agente antiséptico, continuando este uso en la actualidad¹⁵⁸. Los alemanes introdujeron el nitrato de plata para la cura de enfermedades oculares, extendiendo su uso durante la primera Guerra Mundial como agente desinfectante. En la actualidad existe en el mercado un tratamiento antibacteriano para las quemaduras de alto grado formado por una mezcla de plata y fármacos sulfurados^{158,159}.

1.4.2. LA PLATA EN EL MEDIO AMBIENTE

En la naturaleza la plata se encuentra principalmente formando minerales con azufre, la argentita (Ag_2S) o formando también otros minerales como la clorargirita (AgCl). En raras ocasiones se puede encontrar en la naturaleza en forma de pepitas de plata. En el agua, la plata puede formar complejos con los iones cloruro o sulfuro. El grado de complejación dependerá de la salinidad del medio. En medios con baja concentración de sales, la formación de estos complejos será menor y la concentración de Ag^+ presente es mayoritaria; sin embargo, los niveles de plata iónica en medios marinos disminuyen debido a la tendencia de unirse con los aniones. Este mismo fenómeno ocurre si analizamos la profundidad marina^{160,161}.

Las actividades antropogénicas que contribuyen a la contaminación por plata están relacionadas directa o indirectamente con la minería de este metal, y relacionado con su utilización en múltiples aplicaciones: aleaciones y soldaduras, fabricación de baterías, odontología, recubrimientos de vidrio, chips LED, fotografía, energía fotovoltaica (o solar), semiconductores, pantallas táctiles, purificación de agua, etc... Debido a la gran variedad de usos el *Silver Institute*¹⁶², Asociación internacional sin ánimo de lucro compuesta por miembros de las empresas de todos los sectores de la industria de la plata, lo ha denominado "el metal indispensable". Entre todos ellos, las tres principales aplicaciones son la energía solar, la fotografía y en medicina por sus propiedades antibacterianas¹⁶³⁻¹⁶⁵.

1.4.2.1. Ciclo biogeoquímico

El ciclo natural de la plata en los océanos aún no está muy bien definido. El perfil que presenta la plata en este medio es similar al comportamiento que se observa en los nutrientes esenciales, lo que sugiere una vinculación entre ambos ciclos¹⁶⁶. A pesar de la toxicidad probada para el fitoplancton y los organismos invertebrados marinos, aún no existe una relación causal entre las entradas y salidas de plata al medio ambiente. Existen datos que indican que el ciclo de la plata está siendo perturbado por las actividades antropogénicas. Un ejemplo de ello puede ser la incorporación de Ag_2S a través de las precipitaciones, donde la concentración de plata en medios oceánicos pobres en oxígeno disminuye, debido a su acumulación en los sedimentos. Esta hipótesis ha sido probada mediante el análisis de aguas y sedimentos en zonas con niveles pobres en oxígeno^{167,168}. La plata se encuentra a nivel global en niveles menores de 1 ng/m^3 en el aire, y entre $0.2- 2.0 \text{ } \mu\text{g/L}$ en aguas superficiales como lagos y ríos, así como a niveles de $0.20-0.30 \text{ mg/kg}$ en suelo¹⁶⁹. Por ello, se puede decir a día de hoy que no existen problemas graves de contaminación por plata.

1.4.3. TOXICIDAD DE LA PLATA

Los efectos más conocidos asociados a una exposición prolongada a plata muestran una coloración gris azulada en la piel, *argiria*, o en los ojos, *argiriosis*. En ambos casos, los efectos son el resultado de la exposición a las formas solubles de la plata. La exposición continuada puede provocar daños en otros órganos como el hígado, riñones, vías respiratorias y tracto intestinal. La absorción de plata en el organismo puede ser por vía oral, mediante fármacos, o por inhalación tras una exposición ocupacional. En esta última, la exposición se debe a la presencia de compuestos insolubles particulados que pueden causar efectos a concentraciones inferiores a la plata metálica. Una vez incorporados al metabolismo estos compuestos se absorben más rápidamente debido a su capacidad para unirse a proteínas, DNA y RNA, pasando al torrente sanguíneo, distribuyéndose así por todo el cuerpo. Con ayuda de la radiación UV estas sales se reducen a plata metálica, que posteriormente puede oxidarse a sulfuro de plata o seleniuro de plata, originando la pigmentación gris azulada¹⁷⁰.

En el caso de plantas y animales acuáticos, la toxicidad está relacionada con la concentración de plata iónica libre en el medio. Esta plata puede formar complejos con sulfuros o sulfatos, disminuyendo así su toxicidad. Se realizaron estudios para relacionar la toxicidad con la capacidad para la disociación, liberando de este modo la plata iónica, como el AgCl, en medios con sulfuros o sulfatos. Se comprobó una disminución de la toxicidad al menos en tres órdenes de magnitud¹⁷¹.

1.4.4. ¿CÓMO Y DÓNDE SE PRODUCE LA EXPOSICIÓN A LA PLATA?

La población está expuesta a diario a la plata, principalmente a través de los alimentos y del agua potable, y en menor medida por el aire. Otras fuentes de exposición son la vía farmacéutica o la exposición ocupacional, como en joyería, soldaduras o la fotografía. La Conferencia Americana de Higienistas Industriales (OSHA)¹⁷² estableció los límites de exposición ocupacional diferenciando entre plata metálica 0.1mg/m³ y compuestos de plata soluble 0.01mg/m³. Sin embargo, más recientemente el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (MSHA)¹⁷³ ha fijado el mismo límite de exposición en ambos casos en 0.01mg/m³. A pesar de esto, como ya hemos dicho, los niveles de exposición de forma general no son ni mucho menos preocupantes.

1.4.5. TENDENCIAS HACIA EL DESARROLLO SOSTENIBLE

No existen grandes medidas de control ya que no es un contaminante a escala global. Aún así, las medidas que se han establecido para controlar la exposición a elevados niveles de plata y para paliar posibles contratiempos son^{169,173}:

- La USEPA ha recomendado unos niveles máximos para el agua potable de 0.10 mg/L.
- La Administración de Seguridad y Salud Ocupacionales (OSHA) y el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) establecen un límite en el ambiente laboral de 0.01 mg/m³ para un día laboral de 8 horas, en una semana de trabajo de 40 horas.
- Se requiere la notificación de posibles derrames o emisiones accidentales.

CONTAMINANTES EMERGENTES: NANOPARTÍCULAS

En las últimas dos décadas, la nanotecnología se ha extendido muy ampliamente, aumentando considerablemente las aplicaciones con nanomateriales. Los nanomateriales son materiales con al menos una dimensión comprendida en un intervalo entre 1-100 nm.

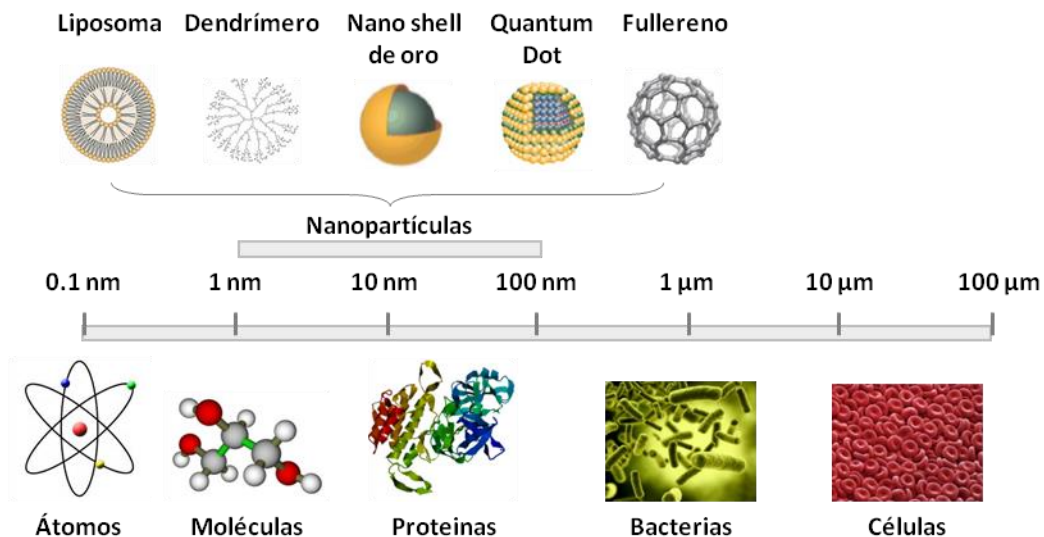


Figura 1.11: Clasificación de materiales en función del tamaño ¹⁷⁴

Las nanopartículas (NPs) son nanomateriales que se caracterizan por tener dos de sus tres dimensiones dentro del rango nanométrico. Debido a este tamaño, sus propiedades despiertan un gran interés, llenando el vacío existente entre los materiales, sus moléculas y sus átomos constituyentes. Las propiedades físicas y químicas están relacionadas tanto con su composición química, como con su superficie, permitiendo realizar modificaciones estructurales funcionalizando las NPs. Estas propiedades hacen que sus aplicaciones entren a formar parte de áreas de gran relevancia como en medicina, física y química y en aplicaciones industriales. La consecuencia directa es la posibilidad de encontrar nanopartículas en todo tipo de productos de consumo: fármacos, cosméticos, cremas solares, ropa, sectores electrónicos.... La exposición constante y creciente a este tipo de materiales, ha despertado un interés en torno a su impacto en el medio ambiente, su posible toxicidad y riesgo para la salud del ser humano¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. La toxicidad de las nanopartículas puede ser debida a las posibles reacciones que pueden tener lugar una vez incorporadas en el organismo humano, de ahí la importancia de su caracterización.

1.5. QUANTUM DOTS (QDs)

1.5.1. ANTECEDENTES

Los Quantum Dots (QDs), son un tipo de nanopartículas inorgánicas que están tomando mucha importancia en los últimos años debido a sus peculiares propiedades. El número de publicaciones científicas ha aumentado de forma considerable, como consecuencia de sus aplicaciones y sus posibles efectos.

1.5.2. PROPIEDADES

Se definen como materiales nanoestructurados, conocidos con varios nombres: puntos cuánticos, nanopartículas semiconductoras, nanocristales semiconductores, semiconductores nanométricos, e incluso átomos artificiales. Son nanopartículas esféricas con un diámetro comprendido entre 1-12 nm, formadas desde 200 hasta 10000 átomos¹⁷⁸. La síntesis de los QDs se lleva a cabo generalmente con elementos pertenecientes a los grupos II-VI, III-V o IV-VI.

Su pequeño tamaño, con dimensiones cercanas o inferiores al radio del excitón de Borh, hace que su comportamiento como nanopartícula sea diferente, ya que siguen las leyes de la física cuántica y no de la física clásica, determinados por el confinamiento cuántico de electrones, de modo que los niveles de energía pasan a ser discretos y finitos. Este confinamiento es responsable de las propiedades optoelectrónicas de los QDs¹⁷⁹. Estos compuestos a escala macro son no fluorescentes, pero cuando se sintetizan en tamaño nanométrico, presentan una emisión luminiscente de larga duración.

Respecto a su composición, existen los QDs formados por elementos de los grupos II-VI, cuyos núcleos pueden ser de sulfuro de zinc (ZnS), seleniuro de zinc (ZnSe), seleniuro de cadmio (CdSe) y telururo de cadmio (CdTe), siendo este grupo donde más interés se ha prestado para el estudio de sus propiedades microelectrónicas y opto electroquímicas. También aparecen, pero menos descritos, los QDs sintetizados con elementos pertenecientes a los grupos III-V, con núcleos formados por fosfuro de indio (InP), arseniuro de indio (InAs), arseniuro de galio (GaAs) y nitruro de galio (GaN). Por tanto, las características más interesantes de los QDs dependen, tanto del tamaño de la partícula como de su composición^{178,180-182}, ofreciendo la posibilidad de tener un amplio espectro de absorción de longitudes de onda. De este modo, se pueden excitar simultáneamente múltiples QDs a distintas longitudes de onda, obteniendo picos de emisión estrechos y simétricos. Esto supone una ventaja frente a los colorantes orgánicos, ya que éstos tienen espectros de emisión más anchos y asimétricos. Otra ventaja de los QDs es su estabilidad, pudiendo someterse a ciclos de excitación-fluorescencia durante horas.

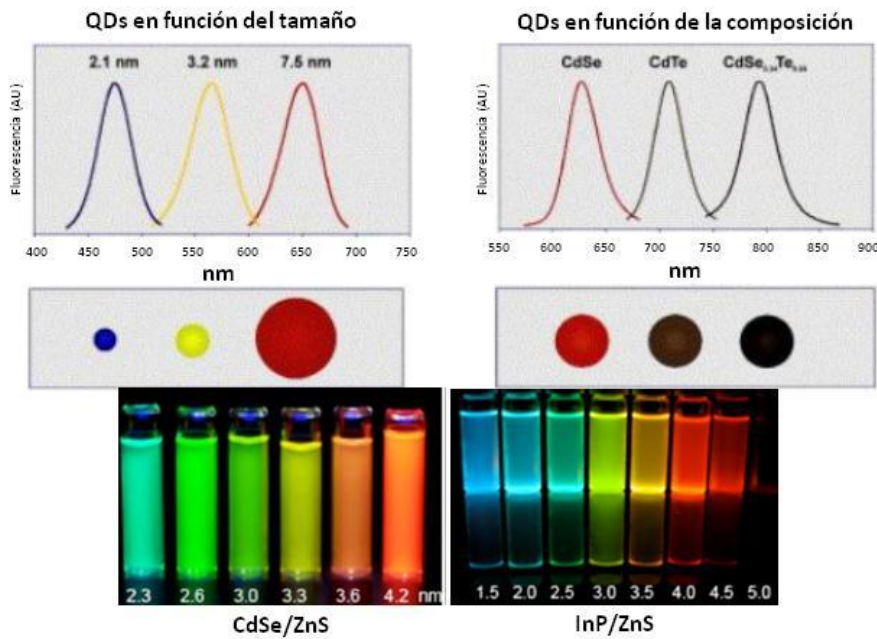


Figura 1.12: Composición y tamaño de los QDs¹⁸³

Lo más habitual es trabajar con QDs que tengan estructura tipo núcleo/recubrimiento, (core/shell). Entre todos ellos, los más utilizados son CdSe/ZnS, CdSe/CdS y ZnSe/ZnS. En este trabajo, se han empleado los denominados “Tipo 1”, donde el salto de banda del material que forma el recubrimiento es mayor que el material que forma el núcleo, de modo que los electrones y los huecos están confinados en el interior del núcleo. Esta disposición es típica de CdSe/ZnS y CdS/ZnS.

Para su aplicación en aplicaciones biológicas es necesario hacerlos compatibles con las biomoléculas. El mayor objetivo de esta solubilidad es la incorporación de

determinados grupos funcionales a la superficie para establecer uniones con la molécula de interés. Las distintas metodologías para solubilizar en agua los QDs son tres¹⁸³: a) intercambio de ligandos hidrófobos por ligandos hidrofílicos; b) silanización, variante de la primera opción, donde se realiza un entrecruzamiento entre los ligandos para formar la capa, haciendo crecer una capa de sílice sobre la superficie; c) interacción hidrofóbica con polímero anfifílico, que consiste en intercalar una serie de cadenas hidrofóbicas de un polímero anfifílico^{184–186}.

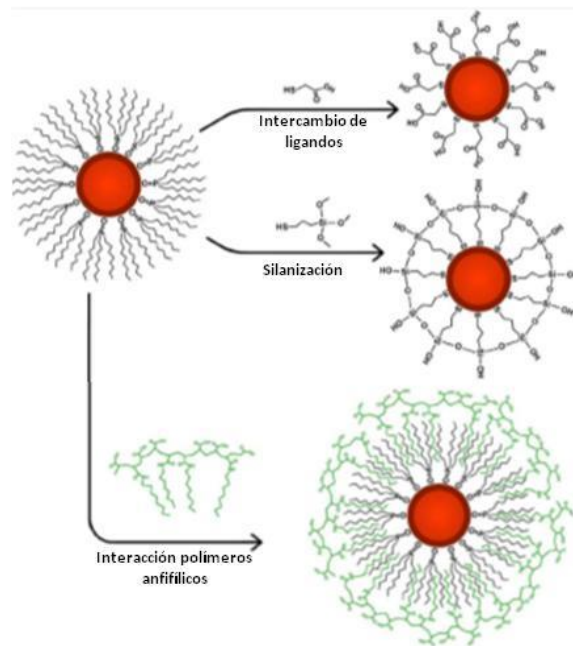


Figura 1.13: Funcionalización de QDs para su solubilización ¹⁸³

1.5.3. APLICACIONES

Las aplicaciones analíticas y bioanalíticas más novedosas se resumen a continuación:

- Sensor directo: esta aplicación se basa en el empleo de los QDs como fase sensora, observando un cambio en la luminiscencia cuando se produce la interacción entre el analito de interés y los QDs, pudiendo monitorizar moléculas, iones y gases^{187,188}.
- Biosensores: basados en la conjugación de la superficie de los QDs con las biomoléculas de interés. El resultado es un reconocimiento selectivo. Estos sensores se emplean, por ejemplo, en inmunoensayos, donde la conjugación de los QDs se realiza con el anticuerpo o con el antígeno, utilizados para el bio-reconocimiento o cuantificación^{189,190}. Otro ejemplo de biosensores son los utilizados en Transferencia de energía, que se basan en un proceso no radiativo, donde la excitación sucede a través de un donador en su estado excitado (fluoróforo) al estado fundamental de un aceptor a través de

interacciones dipolo-dipolo. En este caso los QDs son los donadores y se emplean para la detección de oligonucleótidos¹⁹¹⁻¹⁹⁴

- Marcaje celular: con este propósito se emplean fluoróforos que, emitiendo en diferentes regiones del espectro visible, permite visualizar las estructuras y orgánulos de la célula. Los QDs son una alternativa a los fluoróforos convencionales ya que debido a su amplio espectro de absorción se pueden excitar QDs de distintos tamaños a la misma longitud de onda, obteniendo emisiones diferenciadas¹⁹⁵.
- Obtención de imágenes: esta aplicación se puede realizar tanto “in vitro” como “in vivo”. Tienen gran importancia en estudios genómicos y proteómicos. Se pueden distinguir: i) “In vitro”: el número de sondas para llevar a cabo esta monitorización es muy escaso, por este motivo los QDs representan una alternativa debido a su gran potencial como marcador a tiempo real y su sensibilidad para el marcaje de moléculas sencillas^{193,194}; ii) “In vivo”: el marcaje de macromoléculas en animales vivos se realiza con proteínas fluorescentes y marcadores orgánicos, pero el uso de QDs está ganando terreno a los marcadores habituales. Este aumento se debe a su gran área superficial, permitiendo la bioconjugación a un número mayor de sondas con uniones muy específicas. La posibilidad de obtener imágenes multicolor con el empleo de los QDs es una herramienta beneficiosa para el análisis de muestras de tejidos, reduciendo el tiempo de análisis y aumentando el número de biomarcadores sujetos a examen^{196,197}. Debido a la posible emisión en el IR cercano, pueden penetrar más profundamente en los tejidos, siendo una vez más una prometedora alternativa a los colorantes orgánicos más convencionales¹⁹⁸. Además, la posibilidad de realizar seguimientos de diferentes marcadores moleculares simultáneamente, supone una herramienta para clasificar y diferenciar enfermedades¹⁹⁹.

1.5.4. TOXICIDAD DE LOS QDs

La liberación de los QDs al medio ambiente se produce fundamentalmente como residuos procedentes de los laboratorios que los sintetizan o investigan con ellos y a las aplicaciones clínicas. Como ya se ha descrito los QDs no son todos iguales, por lo que la toxicidad dependerá del tamaño, carga, concentración, estabilidad mecánica, fotolítica y oxidativa y de la actividad biológica del recubrimiento^{200,201}. Por otro lado, el núcleo de los QDs está constituido por metales, muchos de ellos tóxicos a bajas concentraciones. Establecer la toxicidad es complicado porque depende del estado de oxidación del elemento central y de las transformaciones y/o degradaciones que tengan lugar en el medio. Incluso en este caso, pueden darse alteraciones significativas

en la fisiología de la célula, repercutiendo en sus funciones^{202,203}. Algunas de las hipótesis más relevantes de la posible toxicidad de estas nanopartículas vienen dadas por la posible degradación del núcleo. En el caso de los QDs de CdSe, cuando están expuestos a medios oxidantes, puede liberarse el Cd pudiendo inducir estrés oxidativo, daño mitocondrial o apoptosis, como se muestra en la figura 1.14. Hay investigaciones que intentan reducir estos riesgos mediante encapsulación de los QDs, de modo que estén más protegidos, reduciendo así las posibles degradaciones²⁰⁴.

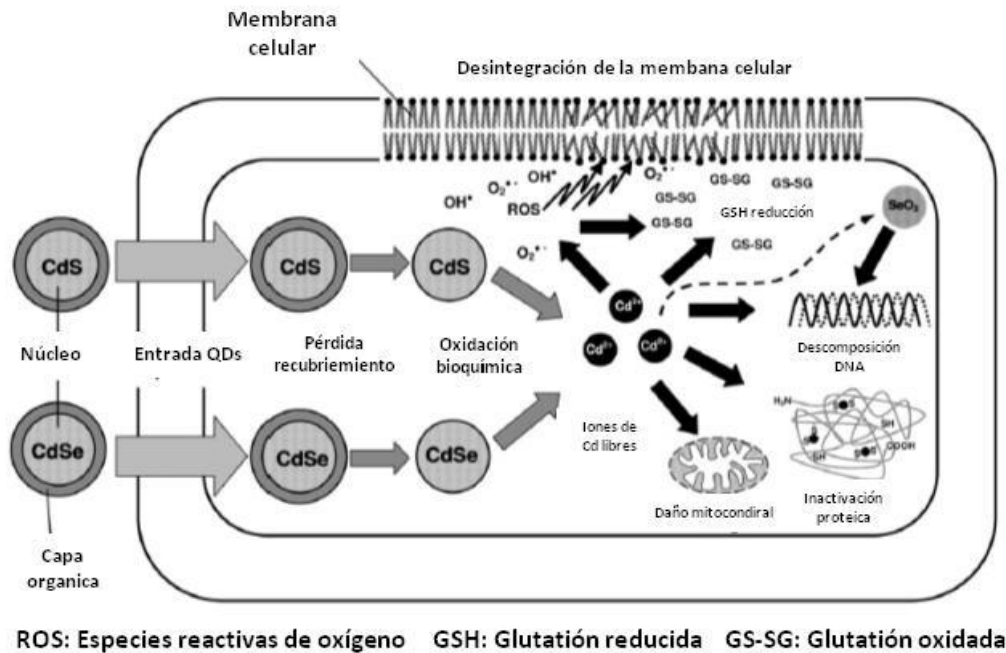


Figura 1.14: Posibles rutas y transformaciones de los QDs en el interior celular¹⁹⁴

En resumen, el riesgo potencial de los QDs se debe tanto al nanomaterial en sí, como a la liberación al medio de sus iones metálicos. Su evaluación es complicada, puesto que cada nanopartícula tiene una composición única (núcleo y ligandos) y los productos de degradación dependerán de la aplicación final del material. En general, se utilizan modelos vivos para llevar a cabo los efectos “in vivo” de los contaminantes. El uso de larvas del pez cebra aparece como un modelo viable, ya que el tiempo de los experimentos no es demasiado largo, así como los costes de los experimentos y no hay tantas limitaciones desde el punto de vista ético. Por ello, en esta tesis se ha seleccionado este modelo para realizar uno de los pocos estudios relativos a toxicidad de los QDs.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diario Oficial de la Unión Europea. *Directiva 2013/39/EU*; **2013**; pp. 1–17.
- (2) Europea, U. Directiva 2008/105/CE. Relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. *D. Of. la Unión Eur.* **2008**, 348, 84–97.
- (3) Murray, K. E.; Thomas, S. M.; Bodour, A. a. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ. Pollut.* **2010**, 158, 3462–3471.
- (4) Herrero, O.; Pérez Martín, J. M.; Fernández Freire, P.; Carvajal López, L.; Peropadre, a.; Hazen, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the Allium cepa test. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, 743, 20–24.
- (5) L. J. Goldwater. Mercury in the environment. *Sci. Am.* **1972**, 15–21.
- (6) Sunderman, F. W.; Ph, D.; Jefferson, T. Perils of Mercury. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1988**, 18, 89–101.
- (7) D'itri, P. A. D. F. M. Mercury Contamination: A Human tragedy. *Jonh Wiley sons* **1977**, 16–28.
- (8) Sutton, R. The pink disease. A case report. *Cutan. Med. Pract.* **1981**, 169–173.
- (9) Poulin, J; Gibb, H. Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. *Organ. Mund. para la Salud Salud Pública y medio Ambient. Ginebra* **2008**.
- (10) However, I.; The, I.; Seed, A. T.; Authority, I. D.; Health, W. Conference on intoxication due to alkylmercury-treated seed. Baghdad, Iraq, 91-3 September 1976. In *Conference on intoxication due to alkylmercury-treated seed.*; **1976**; Vol. 53, pp. 5–8.
- (11) Hinton, J.; Veiga, M. Mercury Contaminated Sites: A Review of Remedial Solutions. In *Proc. NIMD (National Institute for Minamata Disease) Forum 2001. Mar. 19-20, 2001, Minamata, Japan*; **2001**.
- (12) Driscoll, C. T.; Mason, R. P.; Chan, H. M.; Jacob, D. J.; Pirrone, N. Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 4967–4983.
- (13) Li, W. C.; Tse, H. F. Health risk and significance of mercury in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, 22, 192–201.
- (14) Feng, X.; Tang, S.; Shang, L.; Yan, H.; Sommar, J.; Lindqvist, O. Total gaseous mercury in the atmosphere of Guiyang, PR China. *Sci. Total Environ.* **2003**, 304, 61–72.
- (15) Villarejo, A. L. D. Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. *Anal. Ral Acad. Nac. Farm* **2004**, 933–959.
- (16) Nriagu, J.; Becker, C. Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories. *Sci. Total Environ.* **2003**, 304, 3–12.
- (17) Andersson, A. *Mercury in soils. In: The biogeochemistry of mercury in the*

- environment. J.O. Nriagu. Ed Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York; 1979.*
- (18) Fitzgerald, W. F.; Mason, R. P.; Vandal, G. M. Atmospheric cycling and water exchange of mercury over midcontinental lacustrine regions. *Water ,Air Soil Pollut* **1991**, *56*, 746–767.
 - (19) Mason, R. P.; Fitzgerald, W. F.; Moral, M. M. The biogeochemical cycling of element mercury : anthropogenic influences. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, 3191–3198.
 - (20) Selin, N. E. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2009**, *34*, 43–63.
 - (21) Stein ED, Cohen Y, W. A. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Crit Rev Env. Sci Technol.* **1996**, 1–43.
 - (22) Pirrone, N.; Costa, P.; Pacyna, J.; Ferrara, R. Mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources in the Mediterranean region. *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 2997–3006.
 - (23) Unep. Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases, and Environmental Transport. *Unep* **2013**, 42.
 - (24) Pirrone N. Mahaffey K.R. *Dynamics of mercury pollution on regional and global scales: atmospheric processes and human exposures around the world. New York: Springer 2005; 2005.*
 - (25) Munthe J, M. W. Some aqueous reactions of potential importance in the atmospheric chemistry of mercury. *Atmos. Environ.* **1992**, *26A*, 553–557.
 - (26) Lin CJ, Pongprueksa P, Lindberg SE, Pehkonen SO, Byun D, J. C. Scientific uncertainties in atmospheric mercury models I: model science evaluation. *Atmos. Environ.* **2006**, 2911–2928.
 - (27) Adirano DC. *Trace elements in the terrestrial environment. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. Ed springer; 2001.*
 - (28) Slemr, F.; Brunke, E. G.; Ebinghaus, R.; Kuss, J. Worldwide trend of atmospheric mercury since 1995. *Atmos. Chem. Phys.* **2011**, *11*, 4779–4787.
 - (29) Cossa D, G. C. Mercury speciation in the Lower St. Lawrence Estuary. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2000**, *57*, 138–147.
 - (30) Korthals, E.; Winfrey, M. Seasonal and spatial variations in mercury methylation and demethylation in an oligotrophic lake. *Appl. Env. Microbiol* **1987**, *53*, 2397–2404.
 - (31) Ullrich SM, Tanton TW, A. S. Mercury in aquatic environmental: a review of factors affecting methylation. *Crit Rev Env. Sci Technol.* **2001**, *31*, 241–293.
 - (32) C. Triffreau, J. Lützenkirchen, P. B. Modelling the adsorption of mercury (II) on (Hydr)oxides: I. Amorphous iron oxide and a quartz. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1995**, *172*, 82–93.
 - (33) Engstrom DR. Fish respond when the mercury rises. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 16394–16395.

-
- (34) Mason RP, F. W. The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Res. Part I* **1993**, *40*, 1897–1924.
- (35) Morel FMM, Kraepiel AML, A. M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1998**, *29*, 543–566.
- (36) Lamborg CH, Fitzgerald WF, Damman AWH, Benoit JM, Balcom PH, E. D. Modern and historic atmospheric mercury fluxes in both hemispheres: global and regional mercury cycling implications. *Global Biogeochem. Cycles* **2002**, *16*, 1104–1114.
- (37) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. *Informe: Evaluación mundial sobre el mercurio*; **2005**.
- (38) Stubner S, Wind T, C. R. Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **1998**, *21*, 569–578.
- (39) Horvat, M.; Nolde, N.; Fajon, V.; Jereb, V.; Logar, M.; Lojen, S.; Jacimovic, R.; Falnoga, I.; Liya, Q.; Faganelli, J.; et al. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Sci. Total Environ.* **2003**, *304*, 231–256.
- (40) Zhang, H.; Feng, X.; Larssen, T. Bioaccumulation of methylmercury versus inorganic mercury in rice (*Oryza sativa* L.) grain. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 4499–4504.
- (41) www.ec.gc.ca.
- (42) www.mercuriados.org/es.
- (43) Bernhoft, R. a. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *J. Environ. Public Health* **2012**, *2012*, 460508.
- (44) Holmes, P.; James, K. a F.; Levy, L. S. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci. Total Environ.* **2009**, *408*, 171–182.
- (45) Berlin, M.; Zalups, R.; Bruce, A. F. Mercury. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press. Eds Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. 2014.; **2014**; pp. 1013–1067.
- (46) Eggleston DW, N. M. Corretalion of dental amalgam with mercury in brain tissue. *J. Prosthet. Dent.* **1987**, *58*, 704–707.
- (47) Klaassen, C. Heavy metals and heavy-metal antagonists. *Pergamon Press* **1990**, *5*, 1592–1614.
- (48) Clarkson, T. W. . G. J. ; D. C. Studies on the equilibration of mercury vapor with blood. *UR Rep* **1961**, *582*, 1–64.
- (49) Suzuki T, Takemoto TI, Shishido S, K. K. Mercury in human amniotic fluid. *Scand. J. Work. Environ. Heal.* **1977**, *3*, 32–35.
- (50) Duffus, J. H. *Toxicología Ambiental Ed Omega S.A. Barcelona, España*; 1993.
- (51) Queipo Abad, S.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I. Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2016**, *36*, 16–21.

-
- (52) Risher, J.; DeWoskin, R. *Report: Toxicological profile for mercury*; **1999**.
- (53) Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL). *List of recommended health-based biological limit values (BLVs) and biological guidance values (BGVs)*; **2014**.
- (54) Menéndez Navarro, A. Un testimonio médico sobre las condiciones de vida y trabajo de los mineros de Almaden en la segunda mitad del siglo XVIII: El prologo del catástrofe morboso de las minas mercuriales de la Villa de Almaden del azogue (1778), de Jose Pares y Franques (+179. *Acta Hisp. ad Med. Sci. Hist. Illus.* **1991**, *11*, 147–196.
- (55) Diario Oficial de la Unión Europea. *Real Decreto 1102/2008/CE. Relativo a la prohibición de la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio y al almacenamiento seguro de mercurio metálico*; **2008**; Vol. 2008, p. 304/75-304/79.
- (56) Peru Support Group. Minería aurífera artesanal y en pequeña escala en Perú: ¿una bendición o una condena?, **2012**, 1–28.
- (57) Telmer, K.; Stapper, D. *Guía práctica: Reducción del uso de mercurio en la minería de oro artesanal y de pequeña escala. PNUMA, AGC and ONUDI*; **2012**.
- (58) Esbrí, J. M.; López-Berdonces, M. A.; Fernández-Calderón, S.; Higuera, P.; Díez, S. Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): an integrated analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 4842–4850.
- (59) EuroChlor. *It's a chlorine thing*; **2014**.
- (60) Neghab, M.; Norouzi, M. A.; Choobineh, A.; Kardaniyan, M. R.; Zadeh, J. H. Health effects associated with long-term occupational exposure of employees of a chlor-alkali plant to mercury. *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* **2012**, *18*, 97–106.
- (61) Clayden, M. G.; Kidd, K. a; Wyn, B.; Kirk, J. L.; Muir, D. C. G.; Driscoll, N. J. O. Mercury Biomagnification through Food Webs Is Affected by Physical and Chemical Characteristics of Lakes. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 12047–12053.
- (62) *Norma Europea EN ISO 14040: 1997 Environmental management- life cycle assessment- Principles and framework*; **1997**.
- (63) Swanson, H.; Kidd, K. Mercury concentrations in Arctic food fishes reflect the presence of anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), species, and life history. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3286–3292.
- (64) Peng, Q.; Greenfield, B. K.; Dang, F.; Zhong, H. Human exposure to methylmercury from crayfish (*Procambarus clarkii*) in China. *Environ. Geochem. Health* **2016**, *38*, 169–181.
- (65) Zero Mercury Working Group. Mercury contamination, exposures and risk: A New Global Picture Emerges. *Zero Mercury Working Group*. **2012**, pp. 1–4.
- (66) www.who.int/immunization/newaroom/thimersal_questions_and_answers/es/
- (67) www.fudoc.cl.
- (68) Newschaffer, C. J.; Falb, M. D.; Gurney, J. G. National autism prevalence trends from United States special education data. *Pediatrics* **2005**, *115*, e277-82.

-
- (69) Bernard R. The Autism Epidemic, Vaccinations, and Mercury. *J. Nutr. Environ. Med.* **2000**, *10*, 261–266.
- (70) Kern, J. K.; Haley, B. E.; Geier, D. A.; Sykes, L. K.; King, P. G.; Geier, M. R. Thimerosal Exposure and the Role of Sulfation Chemistry and Thiol Availability in Autism. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, 3777–3800.
- (71) Organization, W. H. *Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire*; **2012**; Vol. 87.
- (72) Rodríguez-Farre E. The safety of dental amalgam and alternative dental restoration materials for patients and users. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, in press.
- (73) Atesagaoglu, A.; Omurlu, H.; Ozcagli, E.; Sardas, S.; Ertas, N. Mercury exposure in dental practice. *Oper. Dent.* **2006**, *31*, 666–669.
- (74) United Nations Environmental Programme. Conference of Plenipotentiaries on the Minamata Convention on Mercury. Kumamoto, Japan. In *Text of the Minamata Convention on Mercury for adoption by the Conference of Plenipotentiaries*; **2013**; pp. 5–8.
- (75) Mackey, T. K.; Contreras, J. T.; Liang, B. a. The Minamata Convention on Mercury: Attempting to address the global controversy of dental amalgam use and mercury waste disposal. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 125–129.
- (76) Tsuda, T.; Yorifuji, T.; Takao, S.; Miyai, M.; Babazono, A. Minamata disease: catastrophic poisoning due to a failed public health response. *J. Public Health Policy* **2009**, *30*, 54–67.
- (77) Ushijima, K.; Sung, W.; Kawakita, M.; Tanaka, S.; Mukai, Y.; Tamura, K.; Tanaka, M.; Maruyama, S. Effect of minamata disease status and the perception of unfairness on ill health and inequalities in health amongst residents of Shiranui sea communities. *Stress Heal.* **2010**, *26*, 394–403.
- (78) Yorifuji, T.; Tsuda, T.; Inoue, S.; Takao, S.; Harada, M.; Kawachi, I. Critical appraisal of the 1977 diagnostic criteria for Minamata disease. *Arch. Environ. Occup. Health* **2013**, *68*, 22–29.
- (79) Funabashi, H. Minamata Disease and Environmental Governance. *Int. J. Japanese Sociol.* **2006**, *15*, 7–25.
- (80) Moore, C. J. A Review Of Mercury In The Environment (Its Occurrence In Marine Fish) by marine resources division. *Mercury* **2000**, *1*, 1–22.
- (81) FAO. Rotterdam convention on the prior informed consent procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in international trade, **2005**.
- (82) Greenwood, M. Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971-1972 Outbreak. *J. Appl. Toxicol.* **1985**, *5*, 148–159.
- (83) ONU. Informe de la Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo, **1987**.
- (84) Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas 2005. *Comunicación de la comisión al consejo y al parlamento europeo. Estrategia Comunitaria sobre el*

- Mercurio*; **2005**; pp. 1–12.
- (85) <https://ec.europa.eu/jrc/en>.
- (86) Diario Oficial de las Comunidades Europeas. *Directiva 91/157/CEE*; **1991**; pp. 1–8.
- (87) Reddy K.R., Adams J.F., R. C. Potential technologies for remediation of Brownfield. *Pract. Period. Hazardous, Toxic, Radioact. Waste Manag.* **1999**, *3*, 61–68.
- (88) Ortiz Irene, S. J. *Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de vigilancia tecnológica. Madrid i+d*; 2007.
- (89) Henry, J. R. An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury Prepared By Technology Innovation office. *Natl. Netw. Environ. Manag. Stud.* **2000**, 1–55.
- (90) McIntyre, T. Phytoremediation of heavy metals from soils. *Adv Biochem. Engineering Biotechnol* **2003**, *78*, 97–120.
- (91) Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **2002**, *18*, 647–658.
- (92) EPA-542-R-07-012. Treatment Technologies for site Cleanup: Annual status report. **2007**.
- (93) Prasad, M. V.; Freitas, H. de O. Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron. J. Biotechnol.* **2003**, *6*, 285–321.
- (94) Diario Oficial de las Comunidades Europeas. *Reglamento (CE) 466/2001*; **2001**; Vol. 2001, pp. 1–24.
- (95) Vahidnia, A.; van der Voet, G. B.; de Wolff, F. A. Arsenic neurotoxicity — A review. *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26*, 823–832.
- (96) Kintz, P.; Ginet, M.; Marques, N.; Cirimele, V. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *170*, 204–206.
- (97) Generalic, Eni. "Arsénico." EniG. Tabla periódica de los elementos. <http://www.periodni.com/es/as.html>.
- (98) Dembitsky, V. M.; Rezanka, T. Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. *Plant Sci.* **2003**, *165*, 1177–1192.
- (99) Bhattacharya, P.; Welch, A. H.; Stollenwerk, K. G.; McLaughlin, M. J.; Bundschuh, J.; Panaullah, G. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Sci. Total Environ.* **2007**, *379*, 109–120.
- (100) Lievremont, D.; Bertin, P. N.; Lett, M. C. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1229–1237.
- (101) Grillet, J. P.; Adjman, A.; Bernadac, G.; Bernon, J.; Brunner, F.; Garnier, R. Arsenic exposure in the wine growing industry in ten French departments. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2004**, *77*, 130–135.

- (102) Cullen, W. R.; K.J. Reimer. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 713–764.
- (103) Organization World Health. *Arsenic in Drinking-water*; **2011**; pp. 1–24.
- (104) Huang, J. H.; Hu, K. N.; Decker, B. Organic arsenic in the soil environment: Speciation, occurrence, transformation, and adsorption behavior. *Water. Air. Soil Pollut.* **2011**, *219*, 401–415.
- (105) Huang, J. H. Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. *Water. Air. Soil Pollut.* **2014**, *225*, 1–25.
- (106) Mukhopadhyay, R.; Rosen, B. P.; Phung, L. T.; Silver, S. Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 311–325.
- (107) International Agency for Cancer Research. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants including arsenic. International Agency for Cancer Research, Lyon, 2002, Volume 84. In *International Agency for Cancer Research, Lyon, 2002, Volume 84*; **2002**; pp. 15–22.
- (108) Smeester, L.; Rager, J. E.; Bailey, K. A.; Guan, X.; Smith, N.; García-Vargas, G.; Del Razo, L.-M.; Drobná, Z.; Kelkar, H.; Stýblo, M.; et al. Epigenetic Changes in Individuals with Arsenicosis. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 165–167.
- (109) Ventura-Lima, J.; Bogo, M. R.; Monserrat, J. M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 211–218.
- (110) Jomova, K.; Jenisova, Z.; Feszterova, M.; Baros, S.; Liska, J.; Hudecova, D.; Rhodes, C. J.; Valko, M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* **2011**, *31*, 95–107.
- (111) Caldwell, K. L.; Jones, R. L.; Verdon, C. P.; Jarrett, J. M.; Caudill, S. P.; Osterloh, J. D. Levels of urinary total and speciated arsenic in the U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2009**, *19*, 59–68.
- (112) Zhao, F. J.; McGrath, S. P.; Meharg. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 535–559.
- (113) Xu, X. Y.; McGrath, S. P.; Zhao, F. J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytol.* **2007**, *176*, 590–599.
- (114) Ahmad, S.; Kitchin, K. T.; Cullen, W. R. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *382*, 195–202.
- (115) Gebel, T. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* **2000**, *144*, 155–162.
- (116) Derache, R. *Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega. Barcelona 1990.*; **1990**.
- (117) Súnier, M. A.; Devesa, V.; Clemente, M. J.; Vélez, D.; Montoro, R.; Urieta, I.;

- Jalón, M.; M., L. M. Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products. 2002, 50,. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 924–932.
- (118) Sloth, J. J.; Julshamn, K. Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1269–1273.
- (119) Sirot, V.; Guérin, T.; Volatier, J. L.; J., C. L. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Sci. Total Environ.* **2009**, 407, 1875–1885.
- (120) Blanco-Penedo, I.; López-Alonso, M.; Miranda, M.; Hernández, J.; Prieto, F.; R., S. Non-essential and essential trace elements concentrations in meat in cattle reared under organic, intensive or conventional production systems. , 2010, 27, 36-42. *Food Addit. Contam. Part A* **2010**, 27, 36–42.
- (121) Meharg, A. A.; Williams, P. N.; Adomako, E.; Y., Y. L.; Deacon, C.; Villada, A.; J., C. R. C.; Sun, G.; Y., G. Z.; Feldmann, J.; et al. Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 1612–1617.
- (122) Hironaka, H.; Ahmad, S. A. BUET-UNU International Symposium. Fate of arsenic in the environment. 5-6 February 2003 Dhaka, Bangladesh. Eds: Feroze Ahmed Ali, Zafar Adeel. **2003**, 123–128.
- (123) Ali, M. A.; Badruzzaman, A. B. M.; Jalil, M. A.; Hossain, M. D.; Ahmed, M. F.; Masud, A. A.; Kamruzzaman, M.; Rahman, M. A. BUET-UNU International Symposium. Fate of arsenic in the environment. 5-6 February 2003 Dhaka, Bangladesh. Eds: Feroze Ahmed Ali, Zafar Adeel. **2003**, 85–112.
- (124) Ramirez, A. V. Exposición ocupacional y ambiental al arsénico: actualización bibliográfica para investigación científica. *An. la Fac. Med.* **2013**, 74, 237–248.
- (125) Nordstrom, D. K. Worldwide occurrences of Arsenic in Ground Water. *Sci. Compass* **2002**, 296, 64–65.
- (126) Kumar, A.; Namdeo, M.; Mehta, R.; Agrawala, V. Effect of arsenic contamination in potable water and its removal techniques. *Int. J. water Wastewater Treat.* **2015**, 1, 1–11.
- (127) Chakraborti, D.; Mukherjee, S. C.; Pati, S.; Sengupta, M. K.; Rahman, M. M.; Chowdhury, U. K.; Lodh, D.; Chanda, C. R.; Chakraborti; K, A. Arsenic groundwater contamination in Middle Ganga Plain, Bihar, India: a future danger? *Environ. Health Perspect.* **2003**, 111, 1194–1201.
- (128) Argos, M.; Kalra, T.; Pierce, B.; Chen, Y.; Islam, T. A Prospective Study of Arsenic Exposure From Drinking Water and Incidence of Skin Lesions in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* **2011**, 174, 185–194.
- (129) Geen, A. Van; Ahmed, K.; Akita, Y.; Alam, M.; Culligan, P. Fecal contamination of shallow tubewells in Bangladesh inversely related to arsenic. *Environ Sci Technol* 45: 1199-1205. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 1199–1205.
- (130) Caceres, D. D.; Pino, P.; Montesinos, N.; Atalah, E.; Amigo, H.; Loomis, D. Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic

- concentration in a Chilean population. *Environ. Res.* **2005**, *98*, 151–159.
- (131) Solar, C.; Pizarro, I.; Román, D. Presencia de altos niveles de arsénico en tejidos cardiovasculares de pacientes de áreas contaminadas en Chile. *Rev. Chil. Cardiol.* **2012**, *31*, 41–47.
- (132) Anawar, H. M.; Akai, J.; Komaki, K.; Terao, H.; Yoshioka, T.; Ishizuka, T.; Safiullah, S.; Kato, K. Geochemical occurrence of arsenic in groundwater of Bangladesh: Sources and mobilization processes. *J. Geochemical Explor.* **2003**, *77*, 109–131.
- (133) OSM. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/es/>.
- (134) Garelick, H.; Jones, H. Mitigating Arsenic Pollution: Bridging the Gap Between Knowledge and Practice. *Int. Union Pure Appl. Chem.* **2008**, *30*, 1–11.
- (135) Castro-González, M. I.; Méndez-Armenta, M. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *26*, 263–271.
- (136) Ramírez, A. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *An. la Fac. Med.* **2002**, *63*, 51–64.
- (137) European Food Safety Authority. Cadmium in Food. *EFSA J.* **2009**, *980*, 1–139.
- (138) Arroyo, S.; Ortiz, B.; Enrique, L.; Vicentina, C. Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicol. Argentina* **2013**, *21*, 33–49.
- (139) Bosch, A. C.; O'Neill, B.; Sigge, G. O.; Kerwath, S. E.; Hoffman, L. C. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *96*, 32–48.
- (140) www.jnuenvis.nic.in.
- (141) Ejnik, J.; Shaw, C. F.; Petering, D. H. Mechanism of cadmium ion substitution in mammalian zinc metallothionein and metallothionein a domain: Kinetic and structural studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6525–6534.
- (142) Garcia-Rico, Leticia. Robles-burgueño, M. LAS METALOTIONEÍNAS Y SU RELACIÓN CON LA TOXICIDAD DEL CADMIO EN LOS MAMÍFEROS. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2015**, *1*, 113–120.
- (143) Trzcinka-Ochocka, M.; Jakubowski, M.; Razniewska, G.; Halatek, T.; Gazewski, a. The effects of environmental cadmium exposure on kidney function: The possible influence of age. *Environ. Res.* **2004**, *95*, 143–150.
- (144) Olsson IM; Bensryd, I.; Lundh, T.; Ottosson, H.; Skerfving, S.; A, O. Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking-- association of renal effects. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 1185–1190.
- (145) Comisión Europea. Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *D. Of. la Unión Eur.* **2006**, *2006*, 5–24.
- (146) The Council of the European Union. Commission Directive 2003/20/EC establishing the list, concentration limits and labelling requirements for the

- constituents of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and spring wa. *L 126/34 EN Off. J. Eur. Union* **2003**, 2, 34–39.
- (147) Neff, J. *Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water*. Elsevier Science Amsterdam 2002; **2002**.
- (148) Wang, X. S.; Fisher, N. S. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18, 2034–2045.
- (149) Schulz, C.; Angerer, J.; Ewers, U.; Kolossa-Gehring M. The German Human Biomonitoring Commission. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2007**, 210, 373–382.
- (150) Il'yasova, D.; Schwartz, G. G. Cadmium and renal cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 207, 179–186.
- (151) Verougstraete, V.; Lison, D.; Hotz, P. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J Toxicol Env. Heal. B* **2003**, 6, 227–255.
- (152) *Reglamento (UE) N° 488/2014*; **2014**.
- (153) *Serie 64 sobre Aditivos Alimentarios de la OMS, reunión n° 73 del Comité mixto FAO-OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2011.*; **2011**.
- (154) Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2013/56/UE del parlamento Europeo y del consejo de 20 noviembre de 2013. **2013**, 329, 5–9.
- (155) Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 710/2015, de 24 de julio, sobre pilas y acumuladores y la gestión ambiental de sus residuos. **2015**, 177, 62912–62929.
- (156) Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2006/66/CE del parlamento Europeo y del Consejo de de septiembre de 2006. **2006**, 266, 1–14.
- (157) Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2016/217 de la comisión de 16 de febrero de 2016. **2016**, 40, 5–6.
- (158) Eisler, R. *Silver hazard to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review*. Contaminant Hazard Reviews, Report 32, Pautuxent Wildlife Research Center. US Geological Survey, Reston, VA; **1996**.
- (159) Maillard, J.-Y.; Hartemann, P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, 39, 373–383.
- (160) McKay, J. L.; Pedersen, T. F. The accumulation of silver in marine sediments: A link to biogenic Ba and marine productivity. *Global Biogeochem. Cycles* **2008**, 22, 1–17.
- (161) Eckelman, M. J.; Graedel, T. E. Silver emissions and their environmental impacts: A multilevel assessment. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 6283–6289.
- (162) www.silverinstitute.org.
- (163) Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends Biotechnol* **2010**, 28, 580–588.
- (164) Belloni, J. The role of silver clusters in photography. *Comptes Rendus Phys. J.*

- 2002**, 3, 381–390.
- (165) Grandell, L.; Thorenz, A. Silver supply risk analysis for the solar sector. *Renew. Energy* **2014**, *69*, 157–165.
- (166) Benoit, M.; Kudela, R.; Flegal, A. Modeled trace element concentrations and partitioning in the San Francisco estuary, based on suspended solids concentration. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *11*, 5956–5963.
- (167) Kramer, D.; Cullen, J.; Christian, J.; Johnson, W.; Pedersen, T. Silver in the subarctic northeast Pacific Ocean: explaining the basin scale distribution of silver. *Mar. Chem.* **2011**, *123*, 133–142.
- (168) Gallon, C.; Flegal, R. Sources, Fluxes, and Biogeochemical Cycling of Silver in the Oceans. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2015**, *235*, 27–48.
- (169) www.atsdr.cdc.gov/es.
- (170) Drake, P. L.; Hazelwood, K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann. Occup. Hyg.* **2005**, *49*, 575–585.
- (171) Hogstrand, C.; Wood, C. M. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: Implications of water quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 547–561.
- (172) OSHA. (1989) *United States Code of Federal Regulations, 29CFR Part 1910.1000, Air contaminants, final rule. Vol. 54. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration. p. 2702. 1989*
- (173) NIOSH. (2003) *Registry of toxic effects of chemical substances (RTECS): silver. VW3500000 (last updated August 2003) Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health 2003.*
- (174) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2006**, *1760*, 636–651.
- (175) Maurer-Jones, M. a.; Gunsolus, I. L.; Murphy, C. J.; Haynes, C. L. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3036–3049.
- (176) Marquis, B. J.; Love, S. a; Braun, K. L.; Haynes, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* **2009**, *134*, 425–439.
- (177) Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science (80-.).* **2006**, *311*, 622–627.
- (178) Alivisatos, a. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science (80-.).* **1996**, *271*, 933–937.
- (179) Amelia, M.; Lincheneau, C.; Silvi, S.; Credi, A. Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5728.
- (180) Murphy, C. J.; Coffey, J. L. Quantum dots: A primer. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 16–27.
- (181) Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. The use of luminescent quantum dots for optical sensing. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 207–218.

- (182) Mutavdžić, D.; Xu, J.; Thakur, G.; Triulzi, R.; Kasas, S.; Jeremić, M.; Leblanc, R.; Radotić, K. Determination of the size of quantum dots by fluorescence spectroscopy. *Analyst* **2011**, *136*, 2391–2396.
- (183) Bailey, R. E.; Smith, A. M.; Nie, S. Quantum dots in biology and medicine. *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* **2004**, *25*, 1–12.
- (184) Jańczewski, D.; Tomczak, N.; Han, M.-Y.; Vancso, G. J. Synthesis of functionalized amphiphilic polymers for coating quantum dots. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1546–1553.
- (185) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703–707.
- (186) Aldana, J.; Wang, Y. a.; Peng, X. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8844–8850.
- (187) Xia, Y. S.; Zhu, C. Q. Use of surface-modified CdTe quantum dots as fluorescent probes in sensing mercury (II). *Talanta* **2008**, *75*, 215–221.
- (188) Bagher, A. M. Quantum Dots Applications. *Sensors & Transducers* **2016**, *198*, 37–43.
- (189) Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 7602–7625.
- (190) Fernández-Argüelles, M. T.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, a. Simple bio-conjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence-based immunoassays. *Analyst* **2008**, *133*, 444–447.
- (191) Yu, W. W.; Chang, E.; Drezek, R.; Colvin, V. L. Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*, 781–786.
- (192) Coto-Garcia, A. M.; Sotelo-Gonzalez, E.; Fernandez-Arguelles, M. T.; Pereiro, R.; Costa-Fernandez, J. M.; Sanz-Medel, A. Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 29–42.
- (193) Akerman, M. E.; Chan, W. C. W.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12617–12621.
- (194) Geszke-Moritz, M.; Moritz, M. Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 1008–1021.
- (195) Bonilla, J. C.; Bozkurt, F.; Ansari, S.; Sozer, N.; Kokini, J. L. Applications of Quantum Dots in Food Science and Biology. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 75–89.
- (196) Liu, X. L.; Peng, C. W.; Chen, C.; Yang, X. Q.; Hu, M. B.; Xia, H. S.; Liu, S. P.; Pang, D. W.; Li, Y. Quantum dots-based double-color imaging of HER2 positive breast cancer invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *409*, 577–582.

- (197) Vasudevan, D.; Ranganathan, R.; Trinchì, A.; Cole, I. Core – shell quantum dots : Properties and applications. *J. Alloys Compd.* **2015**, *636*, 395–404.
- (198) Cassette, E.; Helle, M.; Bezdetnaya, L.; Marchal, F.; Dubertret, B.; Pons, T. Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 719–731.
- (199) Gao, X. Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 371–373.
- (200) Hardman, R. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 165–172.
- (201) Gomes, S. a O.; Vieira, C. S.; Almeida, D. B.; Santos-Mallet, J. R.; Menna-Barreto, Cesar, C. L.; Feder, D. CdTe and CdSe quantum dots cytotoxicity: A comparative study on microorganisms. *Sensors* **2011**, *11*, 11664–11678.
- (202) Derfus, a M.; Chan, W. C. W.; Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots, Supp. Info. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18.
- (203) Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A. M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717–4732.
- (204) Ballou, B.; Lagerholm, B. C.; Ernst, L. a; Bruchez, M. P.; Waggoner, a S. Support Info3:Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 79–86.

CAPITULO 2: TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE MERCURIO Y DESARROLLO DE MATERIALES ALTERNATIVOS

2.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO

En epígrafes anteriores, se ha explicado la importancia de conocer las especies de mercurio con las que estamos en contacto, bien sea, directa o indirectamente, ya que son estas especies las que nos dan la información sobre la biodisponibilidad y la toxicidad de este elemento¹. Es por eso por lo que la IUPAC definió nuevos conceptos¹⁻³: “Especie química”: *forma inespecífica de un elemento definido como composición isotópica, estado de oxidación y/o estructura molecular compleja* y “Especiación”: *distribución de un elemento entre las especies químicas definidas en la muestra*. Por consiguiente, la suma de todas esas especies debe ser igual al contenido total del elemento en la muestra de estudio⁴.

Ya hemos comentado que el mercurio se encuentra generalmente en el medio natural salvo excepciones a niveles muy bajos de concentración, siendo necesario el uso de técnicas de elevada sensibilidad para su determinación. Además de necesitar elevada sensibilidad, estas técnicas van acompañadas de un tratamiento previo de la muestra, que será más o menos complejo dependiendo de la especie presente y del tipo de matriz a analizar.

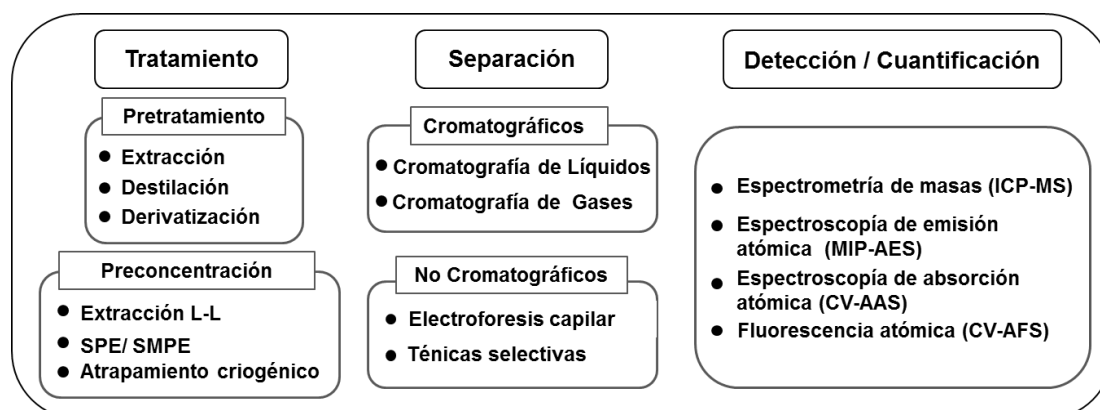


Figura 2.1: Tratamiento de muestra y técnicas de separación para especiación de Hg

Vamos a pasar a describir cada una de las etapas de un análisis de especiación, las más empleadas para el mercurio.

2.1.1. TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRA

La manipulación de la muestra es la etapa clave para garantizar resultados fiables. El muestreo está influenciado por el tipo de analito, la concentración a la que se encuentre, así como la exactitud y la precisión con la que se necesiten los resultados⁵.

Esta etapa suele ser la más larga y tediosa. En ocasiones puede ocurrir contaminación, que puede provenir tanto de los reactivos, como de los contenedores utilizados para almacenar la muestra hasta su análisis, siendo más complicado garantizar la integridad de la concentración y de la especie analizada. Las muestras, por lo general, son propensas a degradarse en un espacio corto de tiempo. Estos cambios físicos o químicos se pueden controlar si se toman las consideraciones necesarias. Las variables a tener en cuenta en el almacenaje son la estabilidad de la muestra ante la luz, la temperatura y la humedad⁵.

En el caso de muestras gaseosas de mercurio, lo más frecuente es la captación en tubos adsorbentes o mediante monitores; si la muestra es pulverulenta se retiene en filtros. En ambos casos el almacenaje se puede realizar a temperatura ambiente, pero es aconsejable mantenerlo refrigerado a 4°C. Cuando se trata de muestras líquidas se recogen en recipientes de vidrio de borosilicato y preferentemente de topacio por la posibilidad de la existencia de CH₃Hg⁺, y serán almacenados a 4°C. En el caso de muestras sólidas se almacenan por lo general a -20°C. En todos los casos los recipientes deben estar bien sellados y conservarse en la oscuridad^{6,7}.

El tratamiento de la muestra puede tener a su vez varias etapas:

2.1.1.1 Etapa de digestión

Este tipo de tratamiento se aplica cuando lo que se desea es medir la cantidad del Hg total previa destrucción de la matriz. Se emplean habitualmente mezclas de ácidos, o también de peróxidos, como el H₂O₂, acompañado de elevadas temperaturas. Debido a la volatilidad del mercurio, esta mineralización debe realizarse en reactores cerrados, para evitar posibles pérdidas. Los ácidos o mezclas que se emplean para llevar a cabo la digestión de la muestra son HNO₃⁸, HNO₃-H₂O₂⁹, HCl¹⁰ y HNO₃⁻ H₂SO₄⁻ H₂O₂¹¹. Con el paso de los años se ha promovido el uso de los hornos microondas focalizados para reducir los tiempos de mineralización, al igual que la cantidad de reactivos utilizados, aumentando la eficiencia y la reproducibilidad^{12,13}. La elección del ácido depende de la muestra, ya que en función del tipo de muestra hay ácidos más afines para llevar a cabo la destrucción de la matriz, ya sea orgánica o inorgánica¹².

2.1.1.2 Etapa de extracción

Contrariamente al párrafo anterior, si lo que se pretende es un análisis de especies de mercurio, esta etapa debe ser cuantitativa y mantener en todo momento la integridad química, no produciéndose transformaciones entre especies durante el proceso¹⁴. Hay dos posibilidades que son las más empleadas:

- Extracción ácida

La extracción ácida con disolventes se basa en el método Westöo, desarrollado a finales de los años 60. Consiste en el empleo de HCl concentrado para liberar el mercurio unido a los grupos tioles de las proteínas¹⁵. Se extrae el CH_3Hg^+ en forma de CH_3HgCl , utilizando el HCl y un disolvente orgánico, el benceno¹⁶. El proceso consta de varias etapas: para extraer el CH_3Hg^+ , se acidifica el medio y se añade el benceno. Como etapa de limpieza se realiza una extracción líquido-líquido, utilizando cisteína o tiosulfato. En último lugar se acidifica y se vuelve a añadir el benceno para extraer el CH_3HgCl . Con el paso de los años, este método se ha ido modificando, aumentando el porcentaje de extracción de la especie orgánica. Para ello se han introducido otras alternativas al empleo del HCl, utilizando mezclas de HCl + NaCl; KBr/ H_2SO_4 ; KBr/ H_2SO_4 / CuSO_4 ó HI¹⁷, además de ampliar el uso de otros disolventes orgánicos, como el tolueno¹⁸, cloroformo¹⁹ o diclorometano, principalmente debido a las propiedades cancerígenas del benceno²⁰. Este proceso implica la sucesión de varias etapas y el empleo de disolventes, dos factores importantes a tener en cuenta. Estos dos factores han fomentado la búsqueda de nuevos métodos de extracción para disminuir el tiempo y el volumen de disolventes a utilizar. Por un lado, el uso del microondas por su rapidez y comodidad se utiliza como agente extractivo con mezclas de ácidos HCl/Tolueno²¹, basada en el método de Westöo o utilizando ácidos como el HNO_3 o mezclas de ácidos HCl/ HNO_3 ^{22,23}. Por otro lado, el empleo de una energía moderada, como es la energía de ultrasonidos ha tenido un gran avance. La extracción se puede realizar en un baño o con una sonda focalizada. El ácido utilizado con más frecuencia es el HCl²⁴. El uso de ultrasonidos no evita el empleo de disolventes orgánicos, pero se reduce considerablemente el volumen a utilizar, al igual que se disminuye el tiempo de extracción, especialmente con el uso de la sonda. La vibración que proporciona esta energía facilita la lixiviación del mercurio de la matriz, mejorando la disgregación y en consecuencia, aumentado la eficiencia de extracción²⁵⁻²⁸.

- Extracción básica

Otro método de extracción de las especies de mercurio es mediante la adición de bases a la muestras. En la actualidad, se puede aplicar a todo tipo de muestras, pero en un principio se aplicaba a muestras sanguíneas, pescados y tejidos blandos²⁹, por la eficacia a la hora de romper los enlaces entre el mercurio y las proteínas³⁰. Esta

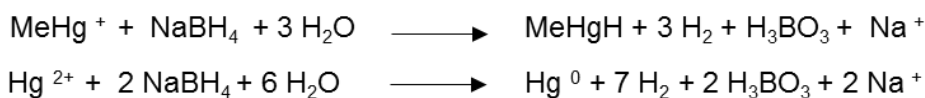
extracción se basa en el tratamiento de la muestra con KOH en metanol³¹ o con otras bases más débiles como el Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)^{23,32}. La elección de la base está condicionada por las posibles pérdidas o metilación del mercurio generando CH_3Hg^+ durante el proceso. Se ha comprobado que el uso de bases fuertes puede dar mayores errores en la cuantificación, por producirse reacciones más exotérmicas^{32,33}. Al igual que ocurría con la extracción ácida, se emplea también combinada con hornos microondas y ultrasonidos, para disminuir el tiempo de tratamiento y aumentar las recuperaciones³⁴.

2.1.1.3 Etapa de derivatización

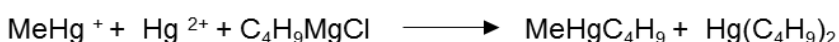
La derivatización consiste en la transformación controlada del analito en otro compuesto para facilitar su análisis. Normalmente, se utiliza para la separación por cromatografía de gases, transformando los analitos poco volátiles en compuestos volátiles. Los reactivos que se utilizan para llevar a cabo estas reacciones tienen que tener propiedades diferentes a la del compuesto obtenido, y se deben añadir en exceso, ya que no son compuestos selectivos⁵. La etilación es el método más utilizado para realizar la derivatización de los compuestos de Hg. Consiste en la formación de derivados dialquilados de Hg, utilizando como agente derivatizante el Tetraetilborato de Sodio (NaEt_4)^{35,36}. Las reacciones que tienen lugar para las dos especies más comunes son las siguientes:



Otro agente que se suele emplear es el Tetrahidroborato de Sodio (NaBH_4), generando el hidruro del metilmercurio³⁵ o reduciendo el mercurio inorgánico a su estado elemental tal y como se muestra en las reacciones:



Otros agentes que se pueden emplear son los reactivos del Grignard³⁷, pero su empleo requiere la ausencia de humedad durante el proceso, ya que son altamente reactivos con el agua. Esto implica una etapa previa para extraer los compuestos de mercurio en disolventes apolares, lo que ha provocado su sustitución paulatina por los reactivos anteriores.



2.2.1.4. Etapa de pre-concentración

Como ya hemos comentado, la concentración en la que se encuentra el mercurio en la naturaleza es a niveles traza y ultratrazo, lo que lleva consigo en muchos casos la necesidad de realizar una etapa de pre-concentración. Las técnicas más ampliamente utilizadas son:

- Extracción en Fase Sólida

Se basa en la utilización de un soporte sólido donde tiene lugar la retención del analito, para posteriormente ser eluido. Esta técnica surgió como alternativa a la extracción Líquido-Líquido³⁸. Las principales características de la SPE son la posibilidad de pre-concentrar el analito de interés en el soporte sólido; permitir la limpieza de muestras o “*clean-up*” mediante la eliminación de las interferencias y el almacenamiento y transporte de los analitos líquidos o gases inestables³⁹. Esta metodología consta de 4 etapas básicas: acondicionamiento, carga, lavado y elución. El acondicionamiento consiste en preparar el adsorbente para después proceder a la etapa de carga de la muestra donde los analitos quedarán retenidos según la afinidad del adsorbente elegido. Después, viene la etapa de lavado en la cual se eliminan las interferencias con los disolventes que se consideren apropiados y, por último, se extrae el analito en la etapa de elución.

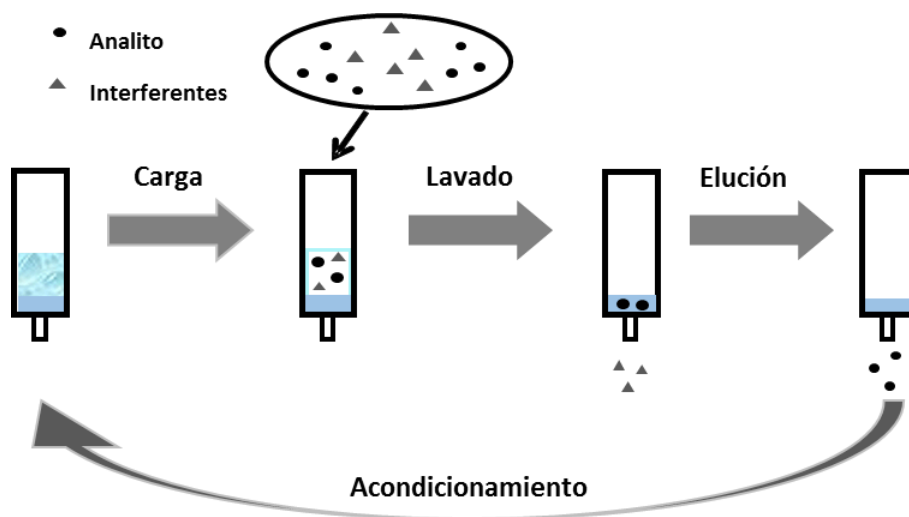


Figura 2.2: Etapas para el desarrollo de la extracción en fase sólida

Las ventajas de esta técnica son la disminución de disolventes empleados para la realización del proceso, y en consecuencia, la disminución de residuos; es selectiva, sencilla y de bajo coste³⁸. Para la retención de las especies de interés el soporte sólido puede ser de naturaleza inorgánica, como gel de sílice o alúmina, o de naturaleza

orgánica, como los polímeros. Se han desarrollado multitud de adsorbentes para ser utilizados en configuración de cartuchos, SPE tradicional, o como mini-columnas conectadas en flujo. Uno de los primeros materiales empleados para la pre-concentración de mercurio fueron unos cartuchos con fibra de algodón modificado con grupos –SH; el mercurio retenido era eluído posteriormente con HCl 2M ⁴⁰. A partir de entonces se han desarrollado una amplia variedad de materiales para la adsorción de mercurio y sus especies. Algunos de esos soportes, inorgánicos y orgánicos son:

- Dietilditiocarbamatos inmovilizados en mini-columnas de C18 para la retención de Hg²⁺ y CH₃Hg⁺. La elución del mercurio se realiza con tiourea al 5% (m/v) en HCl al 0.5% ⁴¹.
- Gel de sílice impregnada con ditizona para la retención de Hg²⁺ y su elución con HCl 10M ⁴².
- Hidrogel de polietilenglicolmetacrilato con vinil-imidazol para la retención de metales pesados como Hg²⁺ > Cd²⁺ > Pb²⁺. La recuperación del Hg²⁺ retenido se realiza con HNO₃ 0.1M ⁴³.
- Hidrogel formado tras polimerización con quitosan y poliacrilamida con retención de Hg²⁺ y Pb²⁺. La elución se realiza con HClO₄ ⁴⁴.
- Adsorbente basado en tiamina inmovilizado en cartuchos de SPE, específico para el Hg²⁺. La elución del mercurio se lleva a cabo con HCl 1M ⁴⁵.
- Carbón modificado con grupos –SH para la retención de Hg²⁺ y su posterior elución con HCl 0.1M ⁴⁶.
- Funcionalización del grafeno para la obtención de nano-adsorbentes de poli (acetoacetato de alilo) con divinilbenceno para la retención de Hg²⁺ y su posterior recuperación con HNO₃ 1M ⁴⁷.
- Poliditiocarbonatos para retener Hg²⁺. La elución se realiza con HNO₃ 0.1M ⁴⁸.

- Microextracción en Fase Sólida

Fue desarrollada en 1989 por Belardi y Pawliszyn⁴⁹. Se basa en la utilización de una fibra de sílice, recubierta con una fase estacionaria adsorbente más o menos selectiva. La fibra se pone en contacto con la muestra, que puede ser líquida o gaseosa, hasta alcanzar el equilibrio analito–fibra, produciéndose una retención selectiva, donde los analitos permanecen hasta su posterior desorción en un inyector a elevada temperatura.

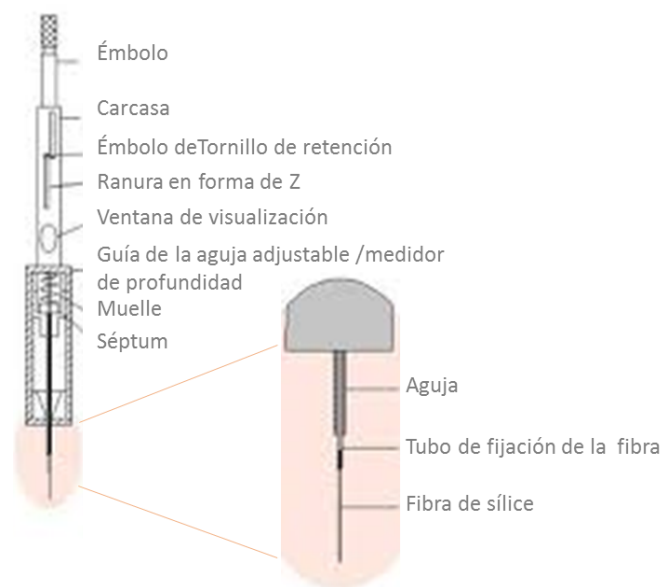


Figura 2.3: Esquema del dispositivo comercial de SPME comercializado por Supelco⁵⁰

En los últimos años, la SPME está ganando terreno a la SPE ya que además de tratarse de una alternativa rápida, simple y libre de disolventes, también se reduce el efecto matriz, los costes son mínimos y puede automatizarse fácilmente⁵¹. Este dispositivo está comercializado por Supelco, la fibra es de sílice fundida, químicamente inerte, estable a elevadas temperaturas y recubierta por un polímero adsorbente³⁹. En el caso del mercurio, la fibra es expuesta a ácido fluorhídrico durante 3.5 h y acondicionada a 200°C durante 2h, mejorando la eficacia de extracción para el metilmercurio⁵². La configuración en espacio de cabeza ofrece mayor sensibilidad para las especies de mercurio más sustituidas porque presentan coeficientes de distribución más elevados, obteniendo óptimos resultados para los derivados propilados y fenílicos^{51,53}. Existen diferentes tipos de fibras de sílice fundida: divinilbenceno (DVB), carboxeno (CAR) y polidimetilsiloxano (PDMS). El uso de las fibras de DVB y CAR ha aumentado el rendimiento de extracción para los compuestos de cadena más corta^{51,54}.

- Atrapamiento criogénico (CT)

Constituye otra alternativa para extraer y pre-concentrar los derivados volátiles de los analitos presentes en la muestra a baja temperatura, mediante el uso de nitrógeno líquido. Para ello, es necesaria una etapa de derivatización, como ya se ha descrito, y purgar con una corriente gaseosa hacia una columna sumergida en N₂ líquido donde se van a quedar retenidos los derivados volátiles. La desorción de los analitos se realiza en función de sus puntos de ebullición. Esta desorción térmica evita el empleo de disolventes para la elución de los analitos, minimizando costes y tiempo, siendo también más limpia^{14,55}.

2.1.2. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS

La separación de las especies de mercurio se puede realizar mediante técnicas cromatográficas o no cromatográficas. Las técnicas utilizadas más ampliamente son las cromatográficas, pero en los últimos años, las investigaciones se han desviado hacia posibles alternativas donde se emplean separaciones no cromatográficas, reduciendo costes y tiempo de análisis.

2.1.2.1 Técnicas cromatográficas

- **Cromatografía de Gases**

Esta separación se aplica a analitos volátiles térmicamente estables. Estas propiedades involucran a un amplio número de compuestos, tanto orgánicos como organometálicos, dotando a esta técnica de gran versatilidad³⁹. En el caso de las especies de mercurio, es ampliamente utilizada para Hg^0 y sus compuestos orgánicos debido a su volatilidad²⁹. Es de fácil manejo, tiene alto poder de resolución y permite un acoplamiento con distintos detectores. La cromatografía de gases lleva consigo la realización de varias etapas: derivatización, pirolisis, separación cromatográfica, detección y cuantificación⁵⁶.

El principio de esta técnica de separación se basa en una fase móvil (gas), inerte químicamente con el analito (generalmente, nitrógeno o helio) y una fase estacionaria, un adsorbente donde se van a quedar retenidos los analitos para su posterior desorción secuencial en función del punto de ebullición hacia el detector. En los primeros estudios de especiación de mercurio, los detectores más empleados fueron el de captura electrónica (ECD) y de ionización en llama (FID)^{57,58}. Con el paso de los años, estos detectores se han ido sustituyendo por otros con mayor sensibilidad como el de fluorescencia y los detectores de masas. Las configuraciones más empleadas son:

- GC-AFS: La fluorescencia atómica representa a día de hoy una de las técnicas más sensibles y selectivas para la determinación de mercurio. El acoplamiento con un cromatógrafo de gases se puede realizar mediante pirólisis⁵⁶. La introducción de la muestra se puede realizar mediante una reacción de alquilación o inyectando directamente la fase orgánica obtenida en la etapa de extracción^{36,59–61}.
- GC-ICP/MS: En este acoplamiento la introducción del plasma como fuente de iones, supuso una gran innovación en el campo de la espectrometría de masas debido a la alta sensibilidad, a la especificidad y a la posibilidad de realizar análisis multi-elementales. Además de las ventajas anteriores, también es posible conocer las relaciones isotópicas, obteniendo de este modo la información sobre las posibles transformaciones de las especies que hayan tenido lugar durante el tratamiento de la muestra^{36,62}. Han sido varios los

estudios dedicados a evaluar la posible formación de metilmercurio durante la extracción de la muestra, mediante la adición de trazadores isotópicos $^{201}\text{Hg}^{2+}$ y $^{201}\text{CH}_3\text{Hg}^+$ en suelos o en muestras biológicas. También se han empleado las relaciones isotópicas para evaluar la capacidad de extracción en materiales de referencia tras la adición del isótopo $^{202}\text{Hg}^{2+}$ ^{63,64}.

- Cromatografía de Líquidos

La cromatografía de líquidos supone otra alternativa para realizar la separación de las especies de mercurio. En concreto la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC), ofrece ventajas frente al empleo de la cromatografía de gases, como es la aplicación directa a compuestos no volátiles con alto o bajo peso molecular, ya que existen diferentes modos de separación (fase reversa o intercambio aniónico). Los mecanismos de separación son más complejos que en cromatografía de gases, permitiendo mejores separaciones en muestras medioambientales. En fase reversa, la fase estacionaria está formada por una base de sílice y la fase móvil puede estar constituida por modificadores orgánicos, agentes quelatantes, pares iónicos o soluciones tamponadas^{65,66}. La principal desventaja de esta técnica es la baja sensibilidad para algunos de los detectores utilizados como UV-Vis. Este detector se utiliza para los complejos mercurio-tioderivados ya que absorben en un amplio intervalo de longitud de onda, siendo necesario etapas de pre-concentración de la muestra⁶⁷. La combinación más utilizada para la cromatografía de líquidos es HPLC-ICP/MS, donde el acoplamiento es muy sencillo, tratándose de una conexión directa de la columna al nebulizador. Generalmente, no es necesario pre-concentrar, el tratamiento de muestra es menos tedioso que en la cromatografía de gases, ya que nos evitamos la etapa de derivatización y los límites de detección son adecuados^{27,28,68-71}. Döker y Boşgelmez incorporaron oxígeno al plasma para conseguir mejores separaciones, en fase reversa utilizando fase móvil con alto porcentaje en contenido orgánico, obteniendo la separación de las especies en 4 min y óptimos límites de detección para ambas especies⁷⁰.

2.1.2.2 Técnicas no cromatográficas

En las técnicas no cromatográficas, las separaciones están basadas en el diferente comportamiento físico-químico que presentan las especies de mercurio. Estas diferencias son solubilidad, volatilidad y potencial redox.

- Electroforesis capilar (CE)

Su empleo está menos extendido que los descritos anteriormente. La CE se lleva a cabo en tubos capilares, de pequeño diámetro, permitiendo utilizar campos eléctricos elevados. La separación se realiza por movilidad electroforética de las especies cargadas. Las ventajas que ofrece esta técnica son la rapidez de la medida, la elevada

eficiencia en la separación y la poca cantidad de muestra que se necesita. En contrapartida, la disminución del volumen de muestra limita la sensibilidad, si comparamos los límites de detección con los obtenidos con las técnicas CG y HPLC^{72,73}. Esta pérdida de sensibilidad se puede solucionar mediante etapas previas de pre-concentración o mediante el acoplamiento a detectores sensibles como el ICP-MS.

La separación de las especies de mercurio por esta técnica es complicada, siendo necesario realizar una etapa previa de derivatización. Esta técnica se ha empleado en muestras de pescado y aguas^{72,74,75}.

- Generación de vapor frío

Otra forma de especiación no cromatográfica se basa en la determinación de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ en función de sus diferentes propiedades químicas, pudiendo ser cuantificados mediante CV-AFS o CV-AAS después de una etapa de reducción a mercurio elemental. En el caso de reducir el Hg^{2+} a Hg^0 se necesitan unas condiciones reductoras con SnCl_2 ^{76,77}. Por el contrario, los compuestos orgánicos de mercurio se descomponen para ser reducidos mediante radiación UV y agentes reductores, como el uso de L-cisteína o $\text{NaBH}_4/\text{KBH}_4$ ⁷⁸⁻⁸⁰. Este método, se caracteriza por su simplicidad en el uso, pero la cuantificación del CH_3Hg^+ debe hacerse en muchos casos por diferencia entre el contenido total de mercurio, obtenido tras previa digestión de la muestra y la concentración de Hg^{2+} resultado de la extracción de especies.

- Analizador directo de mercurio

La determinación de Hg mediante el empleo del analizador directo ha ido en aumento en los últimos años, proponiéndose como una gran alternativa para la determinación de mercurio en matrices complejas, como son los alimentos⁸¹. Su funcionamiento se basa en el secado de la muestra y su posterior descomposición térmica. Para la reducción se emplea un catalizador y el vapor de Hg es atrapado en una amalgama de oro, para posteriormente por desorción térmica, ser analizado por AAS. La principal ventaja es la posibilidad de analizar muestras líquidas o sólidas sin realizar tratamientos previos, disminuyendo así los tiempos de análisis y reduciendo la manipulación de la muestra⁸²⁻⁸⁷. La mayor desventaja de este sistema es que no permite la diferenciación de especies de Hg por lo que para poder especiar hay que aplicar tratamientos previos de muestra⁸⁸.

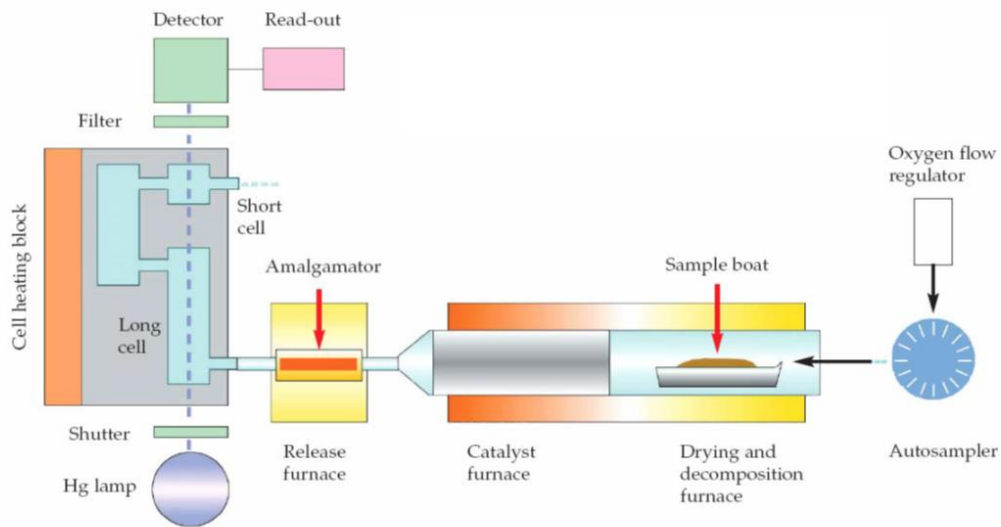


Figura 2.4: Esquema de un analizador directo de mercurio⁸¹

2.2. MATERIALES POLIMÉRICOS PARA DETERMINACIÓN Y ESPECIACIÓN DE MERCURIO

La necesidad de buscar una solución a la problemática del mercurio en el medio ambiente continúa estando vigente, por lo que se siguen proponiendo nuevas soluciones para la retención selectiva y específica de sus compuestos. De este modo, los materiales poliméricos que se están presentando ofrecen alternativas reales para liberar al medioambiente de las emisiones procedentes de las actividades antropogénicas. Por ejemplo, se plantean para su utilización como filtros a la salida de las chimeneas en las áreas industriales, o como sistemas de membrana para limpieza en aguas de desecho o lixiviados. Al mismo tiempo, hay estudios en paralelo para conseguir la especiación del mercurio, de imperativo legal en el caso del área alimentaria, sin necesidad de realizar largos y tediosos tratamientos de muestra.

2.2.1. ANTECEDENTES

En la actualidad las técnicas no cromatográficas no representan una alternativa real frente a las técnicas cromatográficas en la determinación de especies de mercurio. Se ofrecen como métodos complementarios o adicionales para dar mayor validez a los resultados obtenidos.

Las primeras aproximaciones fueron metodologías basadas en el diferente comportamiento químico de las especies. La forma de realizar la especiación era tras la extracción adecuada de las especies y, a continuación, una reducción a Hg⁰ para su detección. Por otro lado, se realiza una digestión para obtener la cantidad de Hg total, y por diferencia se obtiene el valor de la especie deseada. Los detectores más empleados son AAS y AFS, como ya se ha comentado. Los problemas que conlleva esta metodología son la posible pérdida por evaporación de alguna de las especies y lo arriesgado de cuantificar por diferencia. Constituye más un análisis de cribado para verificar de un modo rápido la presencia de una o más especies en la muestra⁸⁹⁻⁹¹.

Con idea de corregir estos problemas se han desarrollado nuevos materiales poliméricos para la retención selectiva de las especies de mercurio, lo que ha llevado consigo el incremento de adsorbentes para la retención y posible especiación de mercurio y sus derivados. En un principio, se apostó por el uso de Polímeros Impresos Moleculares (MIPs), materiales que se basan en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados con reconocimiento molecular selectivo, debido a la formación de cavidades durante el proceso de polimerización, las cuales adquieren la forma, el tamaño y la funcionalidad química del analito elegido como plantilla. Estos polímeros se sintetizan buscando alta especificidad y elevada capacidad de reconocimiento, en nuestro caso, para las especies de mercurio⁹²⁻⁹⁵. Los MIPs se pueden utilizar como adsorbentes en cartuchos de extracción en fase sólida, como fase estacionaria en columnas cromatográficas o como sensores específicos. Las ventajas que ofrece el uso de estos materiales son una disminución de costes, fácil manejo, disminución de disolventes a utilizar y, en consecuencia, de los residuos generados y la posibilidad de reutilizarlos durante varios ciclos. Algunas investigaciones han estado enfocadas al desarrollo de nuevas síntesis de MIPs como alternativa a las técnicas de separación tradicionales, pero al igual que en los casos mencionados anteriormente, la especiación se realiza por diferencia entre el total de mercurio en la muestra, y el retenido en el polímero⁹⁵⁻⁹⁷. En algunos casos, se han utilizado como fase estacionaria, requiriendo el uso de técnicas cromatográficas para detectar la señal final, por lo que son técnicas complementarias^{98,99}. En el caso del uso como sensores, éstos no permiten realizar una especiación, sino sólo el reconocimiento de la especie para la que se han sintetizado⁹⁷. Un problema añadido a estos polímeros impresos es la necesidad de manipular los compuestos de mercurio a elevada concentración para realizar la síntesis, ya que para generar el hueco específico es necesario adicionar el

compuesto durante la polimerización, para después ser eliminado, dejando su huella en el material.

Basándose en el protocolo de la síntesis de estos polímeros, se han desarrollado otros materiales que sin necesidad de tener los huecos específicos para mercurio en su estructura son altamente selectivos. Estos adsorbentes se emplean como alternativas para la remediación de aguas o suelos contaminados por mercurio, gracias a su capacidad de retención, pero no se utilizan para la especiación^{45,100-104}.

2.2.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES ALTAMENTE SELECTIVOS PARA LA RETENCIÓN DE Hg

El desarrollo de estos adsorbentes se realiza buscando las mejores condiciones para que la unión entre sus cadenas poliméricas, ya sea con monómeros selectivos o con los agentes entrecruzantes, y el mercurio sea lo más efectiva posible.

2.2.2.1. Constituyentes principales

- Monómeros

Los monómeros son compuestos de bajo peso molecular que tienen la capacidad de unirse a moléculas más pequeñas, ya sean iguales o diferentes, obteniendo como resultado polímeros. La reactividad dependerá de las perturbaciones electrónicas y del impedimento estérico¹⁰⁵. Existen en el mercado una gran variedad de monómeros funcionales de diversas estructuras químicas y polaridades. Los monómeros pueden interactuar con el analito de interés mediante dos tipos de enlaces, covalentes o no covalentes.

- Interacciones covalentes: Este tipo de unión se basa fundamentalmente en reacciones reversibles de condensación, como la formación de ésteres de borano. Estas interacciones engloban ésteres, amidas y cetonas^{106,107}. Como ventaja de estas interacciones, figura la elevada eficiencia en el enlace entre el analito y el monómero; como principales desventajas la interacción puede transcurrir con cinéticas más largas y la recuperación del analito puede ser más costosa debido a la fortaleza del enlace.
- Interacciones no covalentes: Esta aproximación es la más empleada por la gran variedad de monómeros a elegir¹⁰⁸. La fortaleza de la unión depende del tipo de fuerzas que estén involucradas: interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones π - π o interacciones hidrofóbicas^{109,110}. La estabilidad de la unión es inferior a los enlaces covalentes, pero tienen similar selectividad/especificidad. La cinética de retención es más rápida que en el caso anterior, siendo más fácil su recuperación. Los monómeros más

empleados son los ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos y bases heretocíclicas¹¹¹.

La elección del monómero más adecuado dependerá de las características y los grupos funcionales del analito a retener. Otro factor a tener en cuenta son las posibles interacciones complementarias que puedan producirse entre ambos, porque éstas contribuyen al aumento de la selectividad y de la afinidad hacia el analito¹¹². De forma general, se suele emplear un solo monómero para la síntesis, pero en ocasiones se emplea una mezcla de monómeros para mejorar la selectividad¹¹³.

- Entrecruzante

La función del agente entrecruzante es controlar la morfología tridimensional del polímero, dotándole de la estabilidad y de la resistencia mecánica necesaria al material resultante para llevar a cabo la unión del analito¹¹⁴. Los compuestos más utilizados para este tipo de síntesis son derivados de acrilato y del estireno. El grado de entrecruzamiento requerido depende de la molécula a retener^{48,115,116}. Existen algunos compuestos que poseen tres grupos polimerizables, como es el NOBE (N,O-bis-metacriloil etanolamina): compuesto con doble función, ya que además de actuar como agente entrecruzante, también participa como monómero en la síntesis, no siendo necesaria la adición de un monómero adicional¹¹⁷.

- Iniciador y porógeno

El iniciador es el responsable de crear radicales en los monómeros y, de este modo, propagar la reacción para obtener el polímero. En el caso de enlaces no covalentes, el iniciador más utilizado es el AIBN (Azobisisobutironitrilo), donde la unión se produce mediante puentes de hidrógeno, a temperaturas de 60°C, activándose por vía térmica, o mediante radiación UV⁴⁷. El porógeno es el medio donde se produce la polimerización. Su función es la formación de los poros en la macromolécula. De este modo, la elección del porógeno nos determinará la morfología y el volumen total de poros en el polímero¹¹⁸. En el caso de uniones no covalentes, la fortaleza dependerá de la polaridad y del poder de disociación de nuestro disolvente. Por ejemplo, en el caso de utilizar EGDMA (dimetilacrilato de etilenglicol) y MAA (ácido metacrílico), Los porógenos más adecuados para llevar a cabo la polimerización son los medios apolares, como el tolueno o el diclorometano^{119,120}. En el caso de interacciones covalentes, la naturaleza del porógeno no es tan determinante⁴⁷.

2.2.2.2. Tipos de polimerización

La polimerización se puede llevar a cabo de diferentes formas, la elección de una u otra dependerá de las propiedades y de las aplicaciones demandadas. Los modos de polimerización más utilizados para la obtención de las diferentes configuraciones son:

- En bloque “Bulk”

Esta polimerización fue la primera en emplearse para la obtención de polímeros impresos¹²¹, método más extendido, debido a la simpleza de la síntesis. La polimerización se lleva a cabo en un disolvente orgánico donde se mezclan todos los componentes, resultando un bloque compacto o monolito que es necesario tamizar. La limitación de esta síntesis es la obtención de partículas muy irregulares, con unos tamaños comprendidos entre los 20-50 μm ¹²².

- Precipitación

La polimerización por precipitación se lleva a cabo en un disolvente orgánico en exceso, donde se mezclan todos los componentes. De este modo, las cadenas del polímero comienzan a crecer hasta alcanzar una masa crítica, separándose del disolvente, y formándose en ese punto los núcleos de reacción para dar comienzo la precipitación^{123,124}. Las partículas resultantes son esféricas y el tamaño no suele exceder las 10 μm , pudiéndose llegar incluso a escala sub-micrón¹²⁵. Debido a la rigidez que ofrece el agente entrecruzante, se impide el fenómeno de coalescencia, no haciendo necesario la presencia de otro estabilizante. Las principales ventajas de este tipo de polimerización son la sencillez de la síntesis y la obtención de un polímero formado por partículas esféricas, que no es necesario triturar ni tamizar, aplicándose directamente⁴³. Una desventaja es el pequeño tamaño de partícula que se obtiene, siendo más complicada su aplicación como relleno en columnas de cromatografía¹²⁶.

- En partículas de sílice

Esta síntesis permite la obtención de partículas esféricas. La polimerización se produce en el interior de las partículas de sílice. Estas partículas son de tamaño conocido y una vez producida la polimerización en su interior se redisuelven. Esta reacción se basa en la impregnación de partículas de sílice con la mezcla de polimerización, de modo que se ocupe el espacio de los poros. La reacción se lleva a cabo térmicamente y el resultado es un polímero de igual perfil que las partículas de sílice empleadas^{100,115,127}. La limitación de esta metodología es el estricto control del volumen de disolución de polimerización, porque no debe ser superior al volumen total de los poros. En caso contrario, se produciría también la polimerización en el exterior originándose agregados.

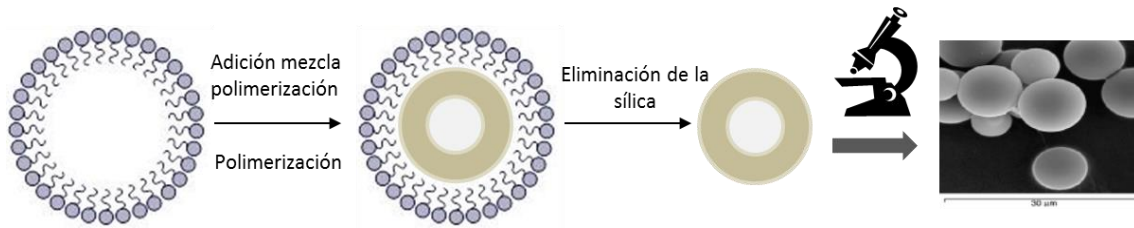


Figura 2.5: Desarrollo modificado de la polimerización en partículas de sílice¹²⁸

○ Injerto o *Grafting*

La polimerización por injerto se basa en la deposición de una película de polímero sobre una superficie conocida¹²⁹. Esta deposición se puede producir por procesos físicos o mediante enlaces covalentes. Estas uniones aumentan la estabilidad de las capas del polímero depositadas sobre el soporte, pero estas uniones pueden verse interferidas por las condiciones del disolvente o la temperatura¹³⁰. Las uniones pueden ser de dos tipos:

- *Grafting-to*: En este tipo de polimerización, el monómero se inmoviliza sobre la superficie elegida, se añade posteriormente la mezcla de polimerización y se lleva a cabo la reacción, formando una capa de polímero sobre toda la superficie. La limitación de esta síntesis es la falta de control sobre la capa de polímero formada¹³¹.
- *Grafting-from*: A raíz de los problemas de control de la capa de polímero formada, se plantearon alternativas para minimizarlos. Para ello, se modificó el agente inmovilizado. En este caso se optó por emplear el iniciador, constituido por partículas homogéneas, para ser inmovilizado en la superficie. De este modo, el crecimiento de las cadenas está más controlado¹³².

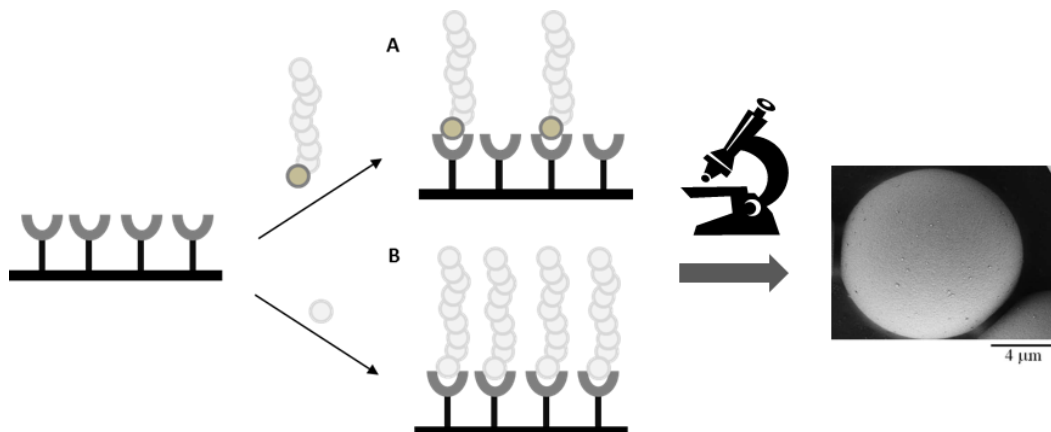


Figura 2.6: Esquema modificado de la polimerización de injerto, A) aproximación “Grafting-to” y B) aproximación “Grafting-from”¹³³

2.2.2.3. Técnicas de caracterización

Para poder verificar si las uniones se han realizado satisfactoriamente podemos clasificar estas técnicas en tres niveles diferentes: Caracterización química, caracterización morfológica y caracterización del sitio de unión.

- Caracterización química

Una característica de los polímeros es su baja solubilidad, dificultando de este modo su caracterización. Por ello, se emplean técnicas químicas que nos permitan realizar el análisis en estado sólido. Algunas de las técnicas empleadas habitualmente son:

- Micro-análisis elemental: Este análisis nos proporciona información sobre el contenido presente en la muestra de diversos elementos, (C, H, N, Cl, O....). Cuando se aplica esta técnica, los datos obtenidos experimentalmente, permiten la comparación con los teóricos, determinando así la cantidad de monómero incorporada a la matriz^{134,135}.
- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR): El empleo de la Transformada de Fourier nos aporta información cualitativa sobre la composición del polímero, informándonos de los grupos funcionales, el grado de polimerización y los tipos de enlaces no covalentes, como enlaces de hidrógeno, que se establecen entre sus cadenas. La limitación de esta técnica es su baja sensibilidad^{136,137}.
- Análisis termogravimétrico (TGA): La termogravimetría se basa en los cambios de masa como resultado de una variación de temperatura o por someter un material a una temperatura establecida durante un periodo definido. Los cambios de masa identificados permiten determinar bajo qué condiciones los materiales se descomponen^{138,139}.
- Resonancia Magnético Nuclear (RMN) de carbono y protón: Las técnicas de RMN también nos permiten trabajar en estado sólido. Nos da información acerca del grado de complejación y con los cambios de señal y los desplazamientos podemos evaluar el tipo de complejo, tipos de unión y los tipos de fuerzas que se establecen^{140,141}.

○ Caracterización morfológica

En el proceso de polimerización las partículas crecen, se desarrollan y se definen, pudiendo encontrarse aisladas o formando grandes agregados. Para estudiar la morfología de estos materiales se emplean las técnicas tradicionales aplicadas a los sólidos porosos. Las características de estos materiales variarán en función de la metodología empleada para su síntesis, de modo que la distribución y volumen de poro, como el área superficial específica serán diferentes.

- Porosimetría: El volumen de poro nos va a determinar el acceso a los puntos de unión presentes en el interior de la matriz polimérica. A mayor porosidad más rápido transcurrirá el proceso de retención. Existen diferentes métodos para determinar el volumen específico (mL/g): se puede realizar una estimación mediante la retención del disolvente, o la aplicación de unos modelos matemáticos, calculando determinados parámetros, para obtener valores más exactos.

Retención de disolvente: Se basa en añadir disolvente al polímero seco, pudiendo de este modo medir el volumen retenido en el mismo y hacer una estimación del volumen específico¹⁰⁵.

Porosimetría por adsorción/desorción de nitrógeno: Consiste en la aplicación de la isoterma S. Brunauer, P. Emmett y E. Teller (BET)¹⁴². Para ello se expone al polímero seco a una corriente de gas, normalmente nitrógeno, a diferentes presiones. Conociendo la cantidad de gas adsorbido en función de la presión se puede estimar el área superficial específica (m²/g), el volumen específico de poro (mL/g), la media de tamaño de poro y el tamaño de los mismos¹⁴³. Este método se aplica para mesoporos y microporos. Según la IUPAC los poros se clasifican como microporos < 2nm; mesoporos entre 2 – 50 nm; macroporos > 50nm¹⁴⁴.

Porosimetría de intrusión/exclusión de mercurio: Basado en introducir en el polímero, bajo presión, una cantidad conocida de mercurio, de modo que tras medir la parte de mercurio que no ha conseguido introducirse en el interior, se puede calcular la cantidad necesaria para rellenar los poros. Esta metodología se aplica para macroporos¹⁰⁵.

- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): Esta técnica nos permite obtener una imagen superficial de las partículas del polímero, pudiendo establecer su homogeneidad y los diámetros de partícula. Su funcionamiento se basa en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra¹⁴⁵. Si la muestra no es conductora, es recubierta con una fina capa de oro o carbón para dotarla de propiedades conductoras. La señal emitida por los electrones y la radiación resultante es recogida por el detector situados en el interior del microscopio que la transforman en imágenes¹⁴⁶.

- Caracterización del sitio de unión: Isotermas de adsorción

En los materiales poliméricos pueden describirse diferentes mecanismos de adsorción de los analitos. Estos mecanismos se pueden evaluar con la isoterma de adsorción adecuada, obteniendo información sobre la constante de afinidad, la selectividad y la densidad de los sitios de unión. Por lo tanto, la elección de la isoterma idónea es fundamental para la obtención de los parámetros.

Por otro lado, se puede establecer la naturaleza de la adsorción, es decir, si se produce por fenómenos físicos o químicos. Del mismo modo, se puede relacionar directamente con la energía libre de Gibbs, y con las constantes termodinámicas, pudiendo deducir la espontaneidad de los procesos de adsorción.

Los modelos de adsorción para evaluar la cantidad de analito que se une al polímero tras añadir concentraciones crecientes del mismo se resumen en la siguiente tabla:

Freundlich	$B = aF^m$
Langmuir	$B = \frac{N_t a F}{1 + a F}$
Bi-Langmuir	$B = \frac{N_{t1} a_1 F}{1 + a_1 F} + \frac{N_{t2} a_2 F}{1 + a_2 F}$
Freundlich-Langmuir	$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m}$
Jovanovic	$B = N_t (1 - e^{-aF})$
Bi-Jovanovic	$B = N_{t1} (1 - e^{-a_1 F}) + N_{t2} (1 - e^{-a_2 F})$
Freundlich-Jovanovic	$B = N_t (1 - e^{-aF^m})$

Tabla 2.1: Modelos matemáticos desarrollados para cálculo de las isotermas de adsorción¹⁴⁷

En estas fórmulas, B representa la cantidad de analito que se une al polímero; F es la cantidad de analito que permanece en la disolución; N_t corresponde a la densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica; a es la constante de afinidad y m es el índice de heterogeneidad que toma valores comprendidos entre 0 (material heterogéneo) y 1 (material homogéneo).

El modelo de Freundlich supone que las superficies de unión son heterogéneas, considerando por tanto, que los sitios de unión son ilimitados. Por otro lado, la isoterma de Langmuir, supone que la adsorción se realiza sobre una superficie con

sitios de unión homogéneos^{148,149}. Jovanovic propuso un nuevo modelo como mejora de la isoterma de Langmuir, teniendo en cuenta además, la homogeneidad y la formación de las monocapas, la interacción vertical entre la superficie y el analito¹⁵⁰. La hipótesis de que todas las superficies son homogéneas supuso una limitación, solventada con modificaciones a estos dos modelos obteniendo, por un lado, las isotermas de Bi-Langmuir y Bi-Jovanovic, que establecen la existencia de sitios de alta y baja afinidad, y por otro lado, las ecuaciones de Langmuir-Freundlich y Jovanovic-Freundlich, que tienen en cuenta un parámetro extra, n , que describe la presencia de distintos tipos de unión¹⁵¹⁻¹⁵³.

La isoterma de Dubinin-Radushkevich nos determina la naturaleza del proceso de adsorción en función de la temperatura. La adsorción a la superficie se puede realizar mediante procesos físicos o químicos. Este modelo está relacionado directamente con las constantes termodinámicas, definiendo simultáneamente si la reacción se lleva a cabo espontáneamente¹⁵⁴.

$$\ln q_e = \ln q_{max} - \beta \varepsilon^2$$

Donde q_e es la cantidad de metal adsorbido por unidad de masa de adsorbente (mol/g), q_{max} es la capacidad de adsorción máxima (mol/g), β es el coeficiente de actividad relacionado con la Energía libre (mol²/J²) y ε es el potencial de Polanyi.

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\beta}}$$

$$\varepsilon = RT \ln(1 + 1/C_e)$$

El proceso de adsorción viene determinado por el valor de la energía. De modo que para valores entre 8-16 kJ/mol, el mecanismo se produce por vía química, mientras que para valores inferiores a 8 kJ/mol, el proceso de adsorción se lleva a cabo por fenómenos físicos. Las constantes termodinámicas, energía libre de Gibbs (ΔG^0), entalpía (ΔH^0) y entropía (ΔS^0) se obtienen mediante la ecuación de Van't Hoff.

$$\ln k_c = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}$$

Siendo T la temperatura absoluta (K) y R la constante cinética de los gases (8.314J/mol.K). Mientras que la energía libre de Gibbs, la podemos obtener a partir de la fórmula, pudiendo relacionarse con el potencial de Polanyi.

$$\Delta G^0 = -RT \ln k_c$$

Los procesos son espontáneos cuando los valores de la energía libre de Gibbs son negativos^{127,153}.

2.2.2.4. Aplicaciones concretas para el mercurio

○ Adsorbentes para SPE

Una elevada capacidad de adsorción, así como una elevada selectividad son clave para su aplicación en este formato. Otra ventaja añadida es la posibilidad de pre-concentrar el analito, aplicación de gran importancia en el caso del mercurio, el cual se encuentra habitualmente a nivel del trazas o ultratrazas.

Es necesaria una optimización previa de las etapas para la obtención de óptimos resultados. Lo ideal es el empleo de medios acuosos para la carga de la muestra, y no en disolventes orgánicos, facilitando su empleo en muestras medioambientales. En la etapa de lavado, el disolvente suele ser el porógeno utilizado en la reacción de polimerización, y en último lugar, la elución, se realiza con aquellos reactivos que favorezcan la ruptura de los enlaces establecidos entre adsorbente y analito¹⁵⁵. Además, este dispositivo ofrece la posibilidad de pre-concentrar la muestra; para ello, durante la etapa de elución, se debe utilizar la mínima cantidad de disolvente para conseguir los óptimos factores de pre-concentración. El rango de aplicación es muy variado, análisis de aguas, alimentos, muestras biológicas y muestras medioambientales. Algunos de los materiales sintetizados para ser utilizados como adsorbente en SPE y sus aplicaciones quedan resumidos en la siguiente tabla 2.2.

Tipo de material	Especie de Hg	Carga	Elución	Saturación (g Hg/g adsorbente)	Aplicaciones	Ref
Hidrogel	Hg ²⁺	20 mL patrón de Hg y agitación	25 mL HNO ₃ 0.1M y 30' de agitación	0.2	-----	43
MIP	Hg ²⁺	50 mL Na ₂ B ₄ O ₇ /NaOH pH 8 con Hg y 1h de agitación	HCl 0.1M en tiourea	0.08	Aguas residuales	98
Hidrogel	Hg ²⁺	100 mL patrón de Hg y agitación 45'	100 mL HClO ₄ y 2h de agitación	0.2	-----	44
MIP	CH ₃ Hg ⁺	50 mL patrón de Hg y agitación 1h	HCl 4M en tiourea 1M y 2h de agitación	0.25	Muestras de pelo y sedimentos sólidos	92
MIP	CH ₃ Hg ⁺	50 mL patrón de Hg y agitación 50'	5 mL HCl 2M en tiourea 1M y 1h de agitación	0.925	Agua de mar	156

Tipo de material	Especie de Hg	Carga	Elución	Saturación (gHg/gsorbente)	Aplicaciones	Ref
MIP	Hg ²⁺	10 mL patrón de Hg y agitación	HCl 0.05 M en tiourea al 5% y 30' de agitación	0.003	Suero sanguíneo	93
Material polimérico	Hg ²⁺	30 mL patrón de Hg y agitación 20'	20 mL de HCl 1M	0.2	Aguas residuales	45
MIP	Hg ²⁺	10 mL tampón acético con Hg y agitación 20'	Agua, HNO ₃ 1M y agua, en etapas consecutivas	0.04	Aguas residuales	157
MIP	Hg ²⁺	25 mL patrón de Hg y agitación 20'	10 mL HCl 0.5 M en tiourea 1M y 20' de agitación	0.02	Aguas de desecho	158
Resinas quelatantes	Hg ²⁺	10 mL patrón de Hg y agitación 24h	----	0.00025	----	101
Carbón activo	Hg ²⁺	100 mL patrón de Hg y agitación 72h	100 mL HCl 0.1M y 24h de agitación	0.248	-----	46
MIP	Hg ²⁺	25 mL tampón fostato con Hg y agitación 50'	Disolución de tiourea	0.028	Aguas residuales	159
Polímero de gel de sílice	Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺	200 mL patrón de Hg	2 mL HCl 0.1M en tiourea 0.1M	0.1 0.08	Agua de río	160
MIP	Hg ²⁺	10 mL patrón de Hg y agitación 20'	2 mL HCl 0.1M en tiourea 0.1M y 30' de agitación	0.024	Vino	96
Hidrogel	Hg ²⁺	10 mL patrón de Hg y agitación 20h	----	2.375	-----	104
MIP	Hg ²⁺	10 mL patrón de Hg y agitación 30'	2 mL HCl 0.1 M en tiourea 0.1M y 30' de agitación	0.04	Muestras acuosas	95
Polímero de gel de sílice	Hg ²⁺	20 mL patrón de Hg y agitación 24h	-----	0.8	-----	161

Tipo de material	Especie de Hg	Carga	Elución	Saturación (gHg/gsorbente)	Aplicaciones	Ref
Nano trampa	Hg ²⁺	50 mL Hg con tampón fosfato y de agitación 12h	No desorben	1	Muestras acuosas	103
MIP	Hg ²⁺	5 mL patrón de Hg	5 mL EDTA 0.1M	0.025	Agua de mar y pescado	162
Material polimérico	Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺	1 mL patrón de Hg	3 mL HCl 2M en metanol 5 mL NaClO ₄ al 20% en HCl 1M	1 (aún sin saturar)	Agua de mar y pescados	163
Grafeno funcionalizado	Hg ²⁺	100 mL patrón de Hg y agitación 20'	50 mL HNO ₃ 1M y 30' de agitación	0.2	Residuos industriales	47
Polycarbonato modificados	Hg ²⁺	20 mL patrón de Hg y agitación 24h	50 mL HNO ₃ 0.1M y 24 h de agitación	0.022	Aguas residuales	48

Tabla 2.2: Materiales poliméricos para la determinación de Hg²⁺ y CH₃Hg⁺ por SPE

Como se muestra en la tabla para llevar a cabo las etapas de la SPE en la mayoría de los casos es necesario realizar una agitación continuada durante distintos intervalos de tiempo, tanto en la etapa de carga, como en la de elución, lo que aumenta el tiempo de ejecución. Por otro lado, se busca capacidad de retención elevada para incrementar las posibilidades de aplicación, pero fundamentalmente se busca un equilibrio entre las condiciones óptimas para la extracción, el tiempo necesario para el mayor porcentaje de retención y la saturación a elevadas concentraciones. Otra observación muy relevante es que de todos los materiales mostrados en la tabla, tan sólo cuatro permiten la determinación de CH₃Hg⁺.

- Membranas

- Muestras líquidas

La síntesis de estos adsorbentes puede variar. La más habitual, por ser más sencilla, es depositar el adsorbente entre dos membranas. Otro modo es fijarlo sobre una superficie mediante la polimerización tipo injerto⁴³. Esta metodología de injerto o grafting, considera algunos factores a tener en cuenta. La porosidad es uno de ellos, ya que a mayor porosidad, mayor es la eficiencia en la complejación con el analito. Pero la eficiencia de la adsorción también depende de los grupos funcionales disponibles en la matriz polimérica¹⁰¹.

El uso de estos adsorbentes varía en función del objetivo final. La utilización como membranas o filtros, se realiza cuando el resultado es la descontaminación o limpieza tanto de las aguas residuales procedentes de complejos industriales, como sistemas internos de refino en ellas ^{47,103,104}. Una aplicación interesante es la estudiada por Fanjun Cao¹⁶¹ donde se utiliza un gel de sílice para retener el mercurio del etanol producido en la biomasa, potenciando su valor como combustible renovable, disminuyendo la corrosión del motor y la formación de sedimentos.

– *Muestras gaseosas*

El mercurio también es producto de desecho en los gases industriales, desarrollándose nuevos materiales adsorbentes para retener el mercurio elemental formado al final de las líneas de emisión de gases. Los formatos en los que los podemos encontrar son de tres tipos:

- Inyección de carbón activado (CA): Se utiliza en forma de polvo, siendo un factor importante el tamaño de partícula: a menor tamaño, se favorece la transferencia entre el gas y el sólido. Estos materiales no son reutilizables, siendo un inconveniente por los costes que supone su síntesis. Bi Zhang¹⁶⁴ mejoró la obtención de estos materiales mediante tratamientos de plasma térmicos, aumentando la capacidad de adsorción del mercurio.
- Adsorbentes no carbonosos: Se sustituye el empleo de carbón por otros materiales, como la alúmina, arcillas o zeolitas. Se están desarrollando nuevos métodos de complejación para aumentar la eficiencia de eliminación del mercurio¹⁶⁵. Boixong Shen utilizó arcillas de titanio apiladas, para dar mayor porosidad, impregnadas en KI, para la retención del Hg⁰ en gases de combustión (O₂, SO₂, H₂O y NO)¹⁴³.
- Amalgamación: El objetivo de la utilización de metales para la retención de mercurio es la posible recuperación del mismo. Los metales más empleados son la plata, el oro y en menor medida el hierro. Se basa en la formación de enlaces en zonas concretas del adsorbente, los denominados Puntos defectuosos (Point defects), donde tras producirse la amalgamación se crean zonas nuevas, propagándose el proceso¹²³.

○ Adsorbente para fases estacionarias selectivas en Cromatografía de Líquidos

Estos materiales poliméricos se pueden utilizar como relleno en columnas de cromatografía, pero plantean una serie de problemas que limitan su aplicación. Las partículas de relleno para fases estacionarias deben ser todas iguales en tamaño, forma y porosidad. Deben ser partículas esféricas y homogéneas. Conseguir estas características tras las diferentes técnicas de polimerización es complicado, ya que en

muchos casos no se puede controlar de forma tan exhaustiva la reacción. Estos problemas se han ido solucionando modificando los tipos de enlaces para aumentar la homogeneidad. Al igual que las polimerizaciones basadas en partículas de sílice o látex favorecen la obtención de partículas esféricas más iguales¹⁶⁶.

Los polímeros más utilizados en estos formatos son los MIPs, los cuales se han aplicado con éxito en una amplia variedad de muestras. En el caso del mercurio, podemos encontrar columnas para el análisis de aguas y sedimentos marinos. Liu et al.⁹⁸ sintetizaron un polímero por precipitación utilizando diazoaminobenzeno y vinilpiridina para la determinación de mercurio inorgánico en sedimentos de río. Emplearon una columna de cristal de dimensiones 100mm x10 mm Ø, y un caudal de 0.5 mL/min. Por otro lado, Soleimani¹⁶² consiguió incrementar el caudal a 1 mL/min utilizando también vinilpiridina en la síntesis modificando el tipo de polimerización en bloque y lo aplicó en muestras de aguas y pescados. Fan et al.⁹⁹ obtuvieron un material mesoporoso funcionalizado con grupos tiólicos para el análisis de mercurio inorgánico en muestras de agua de mar y ríos. En este caso emplearon una columna de menor tamaño 20mm x 3mm Ø, a caudales más altos que los anteriores: 5 mL/min en la carga y 2 mL/min para la elución. Dakova et al.⁹⁶ sintetizaron un material mediante injerto para la determinación de mercurio en vino. La columna empleada fue algo mayor a la de Fan, 60mm x 8mm Ø, utilizando caudales intermedios a los estudios anteriores, 2mL/min para la carga de muestra y 0.5 mL/min en la elución.

- Sensores

En los últimos años se están desarrollando nuevas aplicaciones basadas en la capacidad de reconocimiento de materiales poliméricos, basados en sensores. El funcionamiento de un sensor se basa en la detección de un parámetro físico que convierte en una señal, leída por un observador o instrumento. Los sensores poseen elevada sensibilidad y selectividad, permitiendo análisis en línea a tiempo real¹⁶⁷. El empleo de materiales de elevada selectividad en este tipo de dispositivos ha revolucionado esta técnica. Los sensores ópticos se basan en la funcionalización química de la superficie de las estructuras para la obtención de materiales con las propiedades superficiales deseadas. Los cambios de color provocados por los cromóforos en la reacción con los iones metálicos se utilizan como eventos de señalización, debido a su simple visualización directa. La aplicación de sondas orgánicas en los nanomateriales como receptores se utilizan para el reconocimiento de cationes y moléculas orgánicas cargadas¹⁶⁷. En los sensores fluorescentes, el fluoróforo convierte el reconocimiento del analito en señales ópticas. En el caso del Hg²⁺ se han sintetizado utilizando varios fluoróforos a partir de dansilo, pireno y rodamina, entre otros^{136,168}. En los sensores colorimétricos, los cromóforos son los responsables de la detección “in situ” y en tiempo real del analito. Recientemente, se han desarrollado

varios cromóforos derivados de la rodamina para detectar el mercurio a través de la coordinación entre Hg^{2+} y átomos de azufre^{169,170}.

Los sensores electroquímicos son dispositivos que responden a cambios específicos en la corriente eléctrica o en el potencial como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúe selectivamente con él. En el caso concreto del mercurio se han desarrollado sensores electroquímicos basados en MIPs para el análisis de Hg^{2+} aplicados en aguas residuales con determinaciones potenciométricas y voltamperométricas^{97,171}. También se ha desarrollado un biosensor electroquímico novedoso para la detección Hg^{2+} mediante hibridación de una cadena de ADN, amplificando la señal con la aplicación de nanopartículas de oro (AuNPs) para su aplicación en aguas potables y residuales¹⁷².

Los sensores constituyen una herramienta muy válida para la detección de mercurio en distintos medios con óptimos resultados, tal y como hemos visto, pero no solucionan el problema de la contaminación por mercurio. El empleo de materiales para la retención del mercurio en sus distintas configuraciones, como adsorbente para SPE o fase estacionaria; o en forma de membranas o filtros para la retención del mercurio volátil, son posibles alternativas para la inmovilización de este elemento y eliminarlo del medio. El siguiente paso sería encontrar materiales que además de presentar una elevada capacidad de retención, sean capaces de establecer uniones de elevada fortaleza entre el mercurio y sus cadenas, de modo que el retorno del mercurio al medio sea prácticamente nulo.

En base a todo esto, parte del estudio de esta tesis se ha basado en la búsqueda de materiales selectivos para el mercurio, que además de ofrecer alternativas a la cromatografía de líquidos tradicional, pudiesen aplicarse para la eliminación de mercurio en ambientes contaminados, intentando inhibir al máximo la desorción del mismo, una vez que ha sido atrapado por el material desarrollado.

2.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cornelis R. *Handbook of elemental speciation. Techniques and methodology.* John Wiley and sons; **2003**.
- (2) McNaught, A. D.; Wilkinson, A. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. the "Gold Book".* Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.; **1997**.
- (3) IUPAC. IUPAC Gold Book definition of chemical species <http://goldbook.iupac.org/CT01038.html>.
- (4) Michalke, B. Quality control and reference materials in speciation analysis. *J. Anal. Chem.* **1999**, *363*, 439–445.
- (5) C. Cámara; P. Fernández; A. Martín-Esteban; C. Perez; M Vidal. *Toma y tratamiento de muestras. Síntesis Eds;* **2002**.
- (6) Li-Ping, Y.; Xiu-Ping, Y. Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 245–253.
- (7) PRTR. *Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes: Mercurio (Hg);* **2013**.
- (8) Rodriguez Pereiro, I.; Wasik, A; Lobiński, R. Purge-and-trap isothermal multicapillary gas chromatographic sample introduction accessory for speciation of mercury by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4063–4069.
- (9) Jackie Morton. The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 377–381.
- (10) Chen, F. Y.; Jiang, S. J. Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of As, Cd, and Hg in cereals. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6564–6569.
- (11) Lan, W. G.; Wong, M. K.; Sin, Y. M. Comparison of four microwave digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Talanta* **1994**, *41*, 195–200.
- (12) Gao, Y.; Shi, Z.; Long, Z.; Wu, P.; Zheng, C.; Hou, X. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchem. J.* **2012**, *103*, 1–14.
- (13) Da Silva, M. J.; Paim, A.; Pimentel, M. F.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M. Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *667*, 43–48.
- (14) Ramalhosa, E.; Río-Segade, S. Analytical methods for mercury speciation in several matrixes: a review. *Trends Chromatogr.* **2008**, *2*, 1–35.
- (15) Bermejo-Barrera, P.; Verdura-Constenla, E.; Moreda, A. Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal.*

- Chim. Acta* **1999**, *398*, 263–272.
- (16) Gunnel Westoo. Determination of Methylmercury Compounds in Foodstuffs. *Acta Chem. Scandinavica* **1966**, *20*, 2131–2137.
- (17) Tu, Q.; Qian, J.; Frech, W. Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, *15*, 1583–1588.
- (18) Carro, A. M.; Rubi, E.; Bollain, M. H.; Lorenzo, R. A.; Cela, R. Study Of the Distribution Of Methylmercury and Total Mercury In Grain Size Fractions Of Freeze-Dried Estuarine Sediment Samples. *Appl. Organomet. Chem.* **1994**, *8*, 665–676.
- (19) Aburi, A.; Carro, A. M. Experimental design of a microwave-assisted extraction – derivatization method for the analysis of methylmercury. *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 185–193.
- (20) Thibaud, Y.; Cossa, D. An international intercalibration for methylmercury in biological tissue. *Appl. Organomet. Chem.* **1989**, *3*, 257–266.
- (21) Lorenzo, R. A.; Vazquez, M. J.; Carro, A. M.; Cela, R. Methylmercury extraction from aquatic sediments: A comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 410–416.
- (22) Falter, R.; Hintelmann, H.; Quevauviller, P. Conclusion of the workshop on “sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatisation and detection.” *Chemosphere* **1999**, *39*, 1039–1049.
- (23) Dietz, C.; Madrid, Y.; Cámara, C. Mercury speciation using the capillary cold trap coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 1397–1402.
- (24) López, I.; Cuello, S.; Cámara, C.; Madrid, Y. Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS. *Talanta* **2010**, *82*, 594–599.
- (25) Mason, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: The link, the trends and (probably) the future. *Ultrason. Sonochem.* **2003**, *10*, 175–179.
- (26) Capelo, J. L.; Ximénez-Embún, P.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara, C. Enzymatic Probe Sonication: Enhancement of Protease-Catalyzed Hydrolysis of Selenium Bound to Proteins in Yeast. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 233–237.
- (27) Batista, B. L.; Rodrigues, J. L.; De Souza, S. S.; Oliveira Souza, V. C.; Barbosa, F. Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. *Food Chem.* **2011**, *126*, 2000–2004.
- (28) Chen, X. P.; Han, C.; Cheng, H. Y.; Liu, J. H.; Xu, Z. G.; Yin, X. F. Determination of mercurial species in fish by inductively coupled plasma mass spectrometry with anion exchange chromatographic separation. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *796*, 7–13.
- (29) Cappon, C. J.; Smith, J. C. A simple and rapid procedure for the gas-chromatographic determination of methylmercury in biological samples. *Bull.*

- Environ. Contam. Toxicol.* **1978**, *19*, 600–607.
- (30) So, M. K.; Taniyasu, S.; Lam, P. K. S.; Zheng, G. J.; Giesy, J. P.; Yamashita, N. Alkaline digestion and solid phase extraction method for perfluorinated compounds in mussels and oysters from south China and Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**, *50*, 240–248.
- (31) Liang, L.; Evens, C.; Lazoff, S.; Woods, J. S.; Cernichiari, E.; Horvat, M.; Martin, M. D.; DeRouen, T. Determination of methyl mercury in whole blood by ethylation-GC-CVAFS after alkaline digestion-solvent extraction. *J. Anal. Toxicol.* **2000**, *24*, 328–332.
- (32) Qvarnstrom, J.; Frech, W. Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1486–1491.
- (33) Tseng, C. M.; De Diego, A.; Martin, F. M.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, *12*, 743–750.
- (34) Ramalhosa, E.; Río Segade, S.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, a. Microwave treatment of biological samples for methylmercury determination by high performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analyst* **2001**, *126*, 1583–1587.
- (35) Lin, Y.; Yang, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Hou, X.; Feng, X.; Zheng, C. Ultrasensitive Speciation Analysis of Mercury in Rice by Headspace Solid Phase Microextraction Using Porous Carbons and Gas Chromatography-Dielectric Barrier Discharge Optical Emission Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 2468–2476.
- (36) Huang, J. H. Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *532*, 113–120.
- (37) Pontes, F. V. M.; Carneiro, M. C.; Vaitsman, D. S.; Monteiro, M. I. C.; Neto, A. a.; Tristão, M. L. B. Investigation of the Grignard reaction and experimental conditions for the determination of inorganic mercury and methylmercury in crude oils by GC-ICP-MS. *Fuel* **2014**, *116*, 421–426.
- (38) Poole, C. F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 362–373.
- (39) R. Cela; R A. Lorenzo; M. C. Casais; *Técnicas de separación en Química Analítica. Síntesis*; **2005**.
- (40) Braun, R. D.; Wiechelman, K. J. Determination of methylmercury in natural waters at the sub-nanograms per litre level by capillary gas chromatography after adsorbent preconcentration. *Anal. Chim. Acta* **1989**, *221*, 223–238.
- (41) Blanco, R. M.; Villanueva, M. T.; Enrique, J.; Ur, S.; Sanz-medel, A. Field sampling preconcentration and determination of mercury species in river waters. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *419*, 137–144.

- (42) Sánchez, D. M.; Martín, R.; Morante, R.; Marín, J.; Munuera, M. L. Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography. *Talanta* **2000**, *52*, 671–679.
- (43) Kara, A.; Uzun, L.; Beşirli, N.; Denizli, A. Poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole) beads for heavy metal removal. *J. Hazard. Mater.* **2004**, *106*, 93–99.
- (44) Li, N.; Bai, R.; Liu, C. Enhanced and selective adsorption of mercury ions on chitosan beads grafted with polyacrylamide via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Langmuir* **2005**, *21*, 11780–11787.
- (45) Liu, X.; Qi, C.; Bing, T.; Cheng, X.; Shangguan, D. Specific mercury(II) adsorption by thymine-based sorbent. *Talanta* **2009**, *78*, 253–258.
- (46) Wajima, T.; Sugawara, K. Adsorption behaviors of mercury from aqueous solution using sulfur-impregnated adsorbent developed from coal. *Fuel Process. Technol.* **2011**, *92*, 1322–1327.
- (47) Aghdam, K.; Panahi, H. A.; Alaei, E.; Hasani, A. H.; Moniri, E. Preparation of functionalized graphene oxide and its application as a nanoadsorbent for Hg²⁺ removal from aqueous solution. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*, 1–13.
- (48) Akintola, O. S.; Saleh, T. a.; Khaled, M. M.; Al Hamouz, O. C. S. Removal of mercury (II) via a novel series of cross-linked polydithiocarbamates. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *60*, 602–616.
- (49) R. P. Belardi and J. B. Pawliszyn. Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut. Res. J. Canada* **1989**, *24*, 179–191.
- (50) Zhang, Z.; Yang, M. J.; Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 844A–853A.
- (51) Díez, S.; Bayona, J. M. Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta* **2008**, *77*, 21–27.
- (52) Bin, H.; Gui-Bin, J.; Zhe-Ming., N. Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **1998**, *13*, 1141–1150.
- (53) Carro, A. M.; Mejuto., M. C. Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, *882*, 283–290.
- (54) Geerdink, R. B.; Breidenbach, R.; Epema, O. J. Optimization of headspace solid-phase microextraction gas chromatography-atomic emission detection analysis of monomethylmercury. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1174*, 7–12.
- (55) Leopold, K.; Foulkes, M.; Worsfold, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters--a review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 127–138.
- (56) Gómez-Ariza, J. L.; Lorenzo, F.; García-Barrera, T.; Sánchez-Rodas, D. Analytical

- approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 165–173.
- (57) Liu, W.; Lee, H. K. Chemical modification of analytes in speciation analysis by capillary electrophoresis, liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *834*, 45–63.
- (58) Bin, H.; Gui-Bin, J.; Zhe-Ming., N. Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction. *J. Anal. Atom. Spectrom* **1998**, *13*, 1141–1149.
- (59) Ebdon, L.; Foulkes, M. E.; Roux, S. Le; Muñoz-Olivas, R. Cold vapour atomic fluorescence and gas chromatography-pyro-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. *Analyst* **2002**, *127*, 1108–1114.
- (60) Cai, Y.; Monsalud, S.; Jaffé, R.; Jones, R. D. Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate. Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2000**, *876*, 147–155.
- (61) Louise Armstrong, H. E.; Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; O'Connor, G.; Ebdon, L.; Hywel Evans, E. Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *390*, 245–253.
- (62) León-Pérez, D. E.; Muñoz-Jiménez, A. M.; Jiménez-Cartagena, C. Determination of Mercury Species in Fish and Seafood by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Validation Study. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 2383–2391.
- (63) Pietilä, H.; Perämäki, P.; Piispanen, J.; Majuri, L.; Starr, M.; Nieminen, T.; Kantola, M.; Ukonmaanaho, L. Determination of methyl mercury in humic-rich natural water samples using N₂-distillation with isotope dilution and on-line purge and trap GC-ICP-MS. *Microchem. J.* **2014**, *112*, 113–118.
- (64) Pietilä, H.; Perämäki, P.; Piispanen, J.; Starr, M.; Nieminen, T.; Kantola, M.; Ukonmaanaho, L. Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods. *Chemosphere* **2015**, *124*, 47–53.
- (65) Santos, J. S. dos; Guárdia, M. de la; Pastor, A.; Santos, M. L. P. dos. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. *Talanta* **2009**, *80*, 207–211.
- (66) Hen-Hua Wang, Yong-guang Yin, Bin He, Jian-bo Shi, J. L. and G. J. L-cysteine-induced degradation of organic mercury as a novel interface in the HPLC-CV-AFS hyphenated system for speciation of mercury. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 810–814.
- (67) Harrington, C. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2000**,

- 19, 167–179.
- (68) Chen, X.; Han, C.; Cheng, H.; Wang, Y.; Liu, J.; Xu, Z.; Hu, L. Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1314*, 86–93.
- (69) Cheng, H.; Wu, C.; Shen, L.; Liu, J.; Xu, Z. Analytica Chimica Acta Online anion exchange column preconcentration and high performance liquid chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for mercury speciation analysis. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *828*, 9–16.
- (70) Döker, S.; Boşgelmez, I. I. Rapid extraction and reverse phase-liquid chromatographic separation of mercury(II) and methylmercury in fish samples with inductively coupled plasma mass spectrometric detection applying oxygen addition into plasma. *Food Chem.* **2015**, *184*, 147–153.
- (71) Rodríguez-Reino, M. P.; Rodríguez-Fernández, R.; Peña-Vázquez, E.; Domínguez-González, R.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Mercury speciation in seawater by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry following solid phase extraction pre-concentration by using an ionic imprinted polymer based on methyl-mercury-phenobarbital interaction. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1391*, 9–17.
- (72) Kubáň, P.; Houserová, P.; Kubáň, P.; Hauser, P. C.; Vlastimil, K. Mercury speciation by CE: A review. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 58–68.
- (73) Kubáň, P.; Pelcová, P.; Margetínová, J.; Kubáň, V. Mercury speciation by CE: An update. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 92–99.
- (74) Zhao, Y.; Zheng, J.; Fang, L.; Lin, Q.; Wu, Y.; Xue, Z.; Fu, F. Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2012**, *89*, 280–285.
- (75) Li, B.-H. Rapid speciation analysis of mercury by short column capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 116–121.
- (76) Tirtom, V. N.; Goulding, Ş.; Henden, E. Application of a wool column for flow injection online preconcentration of inorganic mercury(II) and methyl mercury species prior to atomic fluorescence measurement. *Talanta* **2008**, *76*, 1212–1217.
- (77) Cenzano, M. R.; López-Salazar, O.; Cervera, M.; Guardia, M. de la. Non-chromatographic speciation of mercury in mushrooms. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 1774–1779.
- (78) Zhang, W.; Xue, J.; Yang, X.; Wang, S. Determination of inorganic and total mercury in seafood samples by a new ultrasound-assisted extraction system and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 2023–2029.
- (79) Torres, D. P.; Borges, D. L. G.; Frescura, V. L. a.; Curtius, A. J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous

- slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 1118–1122.
- (80) Chelegao, R.; Carioni, V.; Naozuka, J.; Nomura, C. Feasibility of Using AAS for the Characterization of a Tuna Fish Candidate Reference Material for Total Hg and Methyl-Hg Measurement. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 712–718.
- (81) <http://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80.html>.
- (82) Carbonell, G.; Bravo, J. C.; Fernández, C.; Tarazona, J. V. A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *83*, 210–213.
- (83) Cizdziel, J. V.; Tolbert, C.; Brown, G. Direct analysis of environmental and biological samples for total mercury with comparison of sequential atomic absorption and fluorescence measurements from a single combustion event. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2010**, *65*, 176–180.
- (84) Tsai, C. F.; Shih, D. Y. C.; Shyu, Y. T. Survey of total mercury in foods from Taiwan containing red mould rice (*Monascus*) using a direct mercury analyser (DMA). *Food Addit. Contam. Part B* **2010**, *3*, 84–89.
- (85) Vieira, H. P.; Nascentes, C. C.; Windmüller, C. C. Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *34*, 1–6.
- (86) Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. a.; Silva, L. O. B.; Queiroz, A. F. S.; Souza, A. S.; da Silva, E. G. P.; dos Santos, W. N. L.; das Virgens, C. F. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices — A review. *Microchem. J.* **2015**, *121*, 227–236.
- (87) Ribeiro, R. F. L.; Germano, a. Development and validation of a method for the determination of Hg in animal tissues (equine muscle, bovine kidney and swine kidney, and poultry muscle) by direct mercury analysis (DMA). *Microchem. J.* **2015**, *121*, 237–243.
- (88) Calderon, J.; Gonçalves, S.; Cordeiro, F.; Calle, B. de la. *Determination of methylmercury in seafood by direct mercury analysis: standard operating procedure, IMEP-115, EUR 25830 EN 2013*; **2013**.
- (89) Duarte, F. A.; Bizzi, C. A.; Antes, F. G.; Dressler, V. L.; Flores, É. M. D. M. Organic, inorganic and total mercury determination in fish by chemical vapor generation with collection on a gold gauze and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2009**, *64*, 513–519.
- (90) Logar, M.; Horvat, M.; Akagi, H.; Pihlar, B. Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury compounds in natural waters. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1015–1021.
- (91) Shah, a Q.; Kazi, T. G.; Baig, J. a; Afridi, H. I.; Arain, M. B. Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* **2012**, *134*, 2345–2349.
- (92) Liu, Y.; Zai, Y.; Chang, X.; Guo, Y.; Meng, S.; Feng, F. Highly selective determination of methylmercury with methylmercury-imprinted polymers. *Anal.*

- Chim. Acta* **2006**, 575, 159–165.
- (93) Andaç, M.; Mirel, S.; Senel, S.; Say, R.; Ersöz, A.; Denizli, A. Ion-imprinted beads for molecular recognition based mercury removal from human serum. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, 40, 159–166.
- (94) Wang, Z.; Wu, G.; He, C. Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions. *Microchim. Acta* **2008**, 165, 151–157.
- (95) Yordanova, T.; Dakova, I.; Balashev, K.; Karadjova, I. Polymeric ion-imprinted nanoparticles for mercury speciation in surface waters. *Microchem. J.* **2014**, 113, 42–47.
- (96) Dakova, I.; Yordanova, T.; Karadjova, I. Non-chromatographic mercury speciation and determination in wine by new core-shell ion-imprinted sorbents. *J. Hazard. Mater.* **2012**, 231–232, 49–56.
- (97) Alizadeh, T.; Ganjali, M. R.; Zare, M. Application of an Hg²⁺ selective imprinted polymer as a new modifying agent for the preparation of a novel highly selective and sensitive electrochemical sensor for the determination of ultratrace mercury ions. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 689, 52–59.
- (98) Liu, Y.; Chang, X.; Yang, D.; Guo, Y.; Meng, S. Highly selective determination of inorganic mercury(II) after preconcentration with Hg(II)-imprinted diazoaminobenzene–vinylpyridine copolymers. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 538, 85–91.
- (99) Fan, Z. Hg(II)-imprinted thiol-functionalized mesoporous sorbent micro-column preconcentration of trace mercury and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* **2006**, 70, 1164–1169.
- (100) Cao, F.; Yin, P.; Liu, X.; Liu, C.; Qu, R. Mercury adsorption from fuel ethanol onto phosphonated silica gel prepared by heterogenous method. *Renew. Energy* **2014**, 71, 61–68.
- (101) Costa, L. C.; Gomes, A. S.; Coutinho, F. M. B.; Teixeira, V. G. Chelating resins for mercury extraction based on grafting of polyacrylamide chains onto styrene-divinylbenzene copolymers by gamma irradiation. *React. Funct. Polym.* **2010**, 70, 738–746.
- (102) Glenn Fos, John Reynolds, T. B. Achievement for Removing Toxic Mercury. *Lawrence Livermore National Laboratory*. **1999**, pp. 17–22.
- (103) Li, B.; Zhang, Y.; Ma, D.; Shi, Z.; Ma, S. Mercury nano-trap for effective and efficient removal of mercury(II) from aqueous solution. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 1–7.
- (104) Nagai, D.; Daimon, T.; Kawakami, S.; Inoue, K. High-recovery material for mercury ions based on a polyallylamine hydrogel with thiourea groups at cross-linking points. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, 53, 3300–3304.
- (105) Cormack, P. a G.; Elorza, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 804, 173–182.
- (106) Wulff, G. , Sarhan, A. , Zabrocki, Z. . Enzyme-analogue built polymer and their use

- for the resolution of racemates. *Tetrahedron Lett.* **1973**, 4329–4332.
- (107) Shea, K. J.; Sasaki, D. Y. An Analysis of Small-Molecule Binding to Functionalized Synthetic Polymers by ¹³C CP/MAS NMR and FT-IR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4109–4118.
- (108) Spivak, D. a. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1779–1794.
- (109) Dunkin, I. R.; Lenfeld, J.; Sherrington, D. C. Molecular imprinting of flat polycondensed aromatic molecules in macroporous polymers. *Polymer (Guildf)*. **1993**, *34*, 77–84.
- (110) Janiak, D. S.; Kofinas, P. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 399–404.
- (111) Branger, C.; Meouche, W.; Margailan, A. Recent advances on ion-imprinted polymers. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 859–875.
- (112) Sellergren, B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 164–174.
- (113) Wang, JF; Zhou, LM; Meng, ZH; Wang, QH; Zhu, DQ. Highly efficient molecule imprinting chiral stationary phase utilizing combined basic functional monomers. *ACTA Chim. Sin.* **1999**, *57*, 1147–1151.
- (114) Beltran, a.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Cormack, P. a G. Molecularly-imprinted polymers: Useful sorbents for selective extractions. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1363–1375.
- (115) Redko, M. Y.; Manes, K. M.; Taurozzi, J. S.; Jackson, J. E.; Tarabara, V. V. Synthesis and characterization of Aza222-based polymers for the removal of mercury from aqueous solutions. *React. Funct. Polym.* **2014**, *74*, 90–100.
- (116) Rocha, L. S.; Almeida, Â.; Nunes, C.; Henriques, B.; Coimbra, M. a.; Lopes, C. B.; Silva, C. M.; Duarte, A. C.; Pereira, E. Simple and effective chitosan based films for the removal of Hg from waters: Equilibrium, kinetic and ionic competition. *Chem. Eng. J.* **2016**, *300*, 217–229.
- (117) Sibrian-Vazquez, M.; Spivak, D. a. Molecular imprinting made easy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7827–7833.
- (118) Yoshizako, K.; Hosoya, K.; Iwakoshi, Y.; Kimata, K.; Tanaka, N. Porogen Imprinting Effects. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 386–389.
- (119) Gladis, J. M.; Rao, T. P. Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the preconcentration/separation of traces of uranium. *Microchim. Acta* **2004**, *146*, 251–258.
- (120) Zander, Å.; Findlay, P.; Renner, T.; Sellergren, B.; Swietlow, A. Analysis of nicotine and its oxidation products in nicotine chewing gum by a molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3304–3314.
- (121) G. Wulff, A. Sarhan. The use of polymers with enzymeanalogous structures for the resolution of racemates. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1972**, *11*, 341–343.

- (122) Gallego-Gallegos, M.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. Different formats of imprinted polymers for determining organotin compounds in environmental samples. *J. Environ. Manage.* **2009**, *90 Suppl 1*, S69-76.
- (123) Assari, M. J.; Rezaee, A.; Rangkooy, H. Bone char surface modification by nano-gold coating for elemental mercury vapor removal. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *342*, 106–111.
- (124) Huang, H.; Yuan, Y.; Deng, J. Helix-Sense-Selective Precipitation Polymerization of Achiral Monomer for Preparing Optically Active Helical Polymer Particles. *Macromolecules* **2015**, *48*, 3406–3413.
- (125) Arshady, R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. *Colloid Polym. Sci.* **1992**, *270*, 717–732.
- (126) Pérez-Moral, N.; Mayes, A. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 15–21.
- (127) Niu, Y.; Yang, J.; Qu, R.; Gao, Y.; Du, N.; Chen, H.; Sun, C.; Wang, W. Synthesis of Silica-Gel-Supported Sulfur-Capped PAMAM Dendrimers for Efficient Hg(II) Adsorption: Experimental and DFT Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55*, 3679–3688.
- (128) Shin, W.-K.; Cho, J.; Kannan, A. G.; Lee, Y.-S.; Kim, D.-W. Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO₂ Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10.
- (129) Bhattacharya, a.; Misra, B. N. Grafting: A versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 767–814.
- (130) Brittain, W. J.; Minko, S. A structural definition of polymer brushes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 3505–3512.
- (131) Kato, K.; Uchida, E.; Kang, E. T.; Uyama, Y.; Ikada, Y. Polymer surface with graft chains. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 209–259.
- (132) Shamsipur, M.; Fasihi, J.; Ashtari, K. Grafting of ion-imprinted polymers on the surface of silica gel particles through covalently surface-bound initiators: a selective sorbent for uranyl ion. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7116–7123.
- (133) Banerjee, S.; Paira, T. K.; Mandal, T. K. Surface confined atom transfer radical polymerization: access to custom library of polymer-based hybrid materials for speciality applications. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4153–4167.
- (134) Andaç, M.; Say, R.; Denizli, A. Molecular recognition based cadmium removal from human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *811*, 119–126.
- (135) Min, L. Y.; Yuan, Z. L. Molecularly imprinted polymer with salicylaldehyde-Cu(OAc)₂ as template. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 103–108.
- (136) Li, M.; Sun, Y.; Dong, L.; Feng, Q. C.; Xu, H.; Zang, S. Q.; Mak, C. Colorimetric recognition of Cu²⁺ and fluorescent detection of Hg²⁺ in aqueous media by a dual chemosensor derived from rhodamine B dye with a NS2 receptor. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *226*, 332–341.

- (137) Escobar-Barrios, V. a; Rangel-Méndez, J. R.; Pérez-Aguilar, N. V; Andrade-Espinosa, G.; Dávila-Rodríguez, J. L. FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. *Infrared Spectrosc. - Mater. Sci. Eng. Technol.* **2012**, *9*, 195–212.
- (138) Coats, A. W.; Redfern, J. P. Thermogravimetric analysis. A review. *Analyst* **1963**, *88*, 906–924.
- (139) Saad, A.; Bakas, I.; Piquemal, J. Y.; Nowak, S.; Abderrabba, M.; Chehimi, M. M. Mesoporous silica/polyacrylamide composite: Preparation by UV-graft photopolymerization, characterization and use as Hg(II) adsorbent. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *367*, 181–189.
- (140) Brame, E. G. NMR Spectroscopy in the Characterization of Polymers. In *Polymer Characterization; Advances in Chemistry; American Chemical Society*, **1983**; Vol. 203, pp. 23–419.
- (141) Gore, M. a.; Karmalkar, R. N.; Kulkarni, M. G. Enhanced capacities and selectivities for cholesterol in aqueous media by molecular imprinting: Role of novel cross-linkers. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *804*, 211–221.
- (142) Brunauer, S.; Emmett, H. P.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- (143) Shen, B.; Chen, J.; Yue, S. Removal of elemental mercury by titanium pillared clay impregnated with potassium iodine. *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, *203*, 216–223.
- (144) IUPAC. Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1739–1758.
- (145) Perez, R.; Gomez, J. Characterization of nanostructured materials using SEM and HREM techniques. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *40*, 10–21.
- (146) Hasell, T.; Parker, D. J.; Jones, H. a.; McAllister, T.; Howdle, S. M. Porous inverse vulcanised polymers for mercury capture. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5383–5386.
- (147) Baggiani, C.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Tozzi, C.; Anfossi, L. Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template: Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 43–52.
- (148) Freundlich, H. M. F. Over the adsorption in solution. *J. Phys. Chem.* **1906**, *57*, 385–470.
- (149) Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solid and liquids. Part I. Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 2221–2295.
- (150) Jaroniec, M. Adsorption of gas mixtures on heterogeneous surfaces. Analytical solution of integral equation for Jovanovic adsorption isotherm. *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, *53*, 422–428.
- (151) Quiñones, I.; Guiochon, G. Derivation and Application of a Jovanovic–Freundlich Isotherm Model for Single-Component Adsorption on Heterogeneous Surfaces.

- J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *183*, 57–67.
- (152) Limousin, G.; Gaudet, J. P.; Charlet, L.; Szenknect, S.; Barthes, V.; Krimissa, M. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Appl. Geochemistry* **2007**, *22*, 249–275.
- (153) Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* **2010**, *156*, 2–10.
- (154) Hutson, N. D.; Yang, R. T. Theoretical basis for the Dubinin-Radushkevitch (D-R) adsorption isotherm equation. *Adsorption* **1997**, *3*, 189–195.
- (155) Gallego-Gallegos, M.; Liva, M.; Olivas, R. M.; Cámara, C. Focused ultrasound and molecularly imprinted polymers: a new approach to organotin analysis in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 82–88.
- (156) Büyüktiryaki, S.; Say, R.; Denizli, A.; Ersöz, A. Mimicking receptor for methylmercury preconcentration based on ion-imprinting. *Talanta* **2007**, *71*, 699–705.
- (157) Wang, Z.; Wu, G.; He, C. Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions. *Microchim. Acta* **2009**, *165*, 151–157.
- (158) Singh, D. K.; Mishra, S. Synthesis and characterization of Hg(II)-ion-imprinted polymer: Kinetic and isotherm studies. *Desalination* **2010**, *257*, 177–183.
- (159) Firouzzare, M.; Wang, Q. Synthesis and characterization of a high selective mercury(II)-imprinted polymer using novel aminothiols monomer. *Talanta* **2012**, *101*, 261–266.
- (160) Mladenova, E. K.; Dakova, I. G.; Tsalev, D. L.; Karadjova, I. B. Mercury determination and speciation analysis in surface waters. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, *10*, 1175–1182.
- (161) Cao, F.; Yin, P.; Liu, X.; Liu, C.; Qu, R. Mercury adsorption from fuel ethanol onto phosphonated silica gel prepared by heterogenous method. *Renew. Energy* **2014**, *71*, 61–68.
- (162) Soleimani, M.; Afshar, M. G. Highly selective solid phase extraction of mercury ion based on novel ion imprinted polymer and its application to water and fish samples. *J. Anal. Chem.* **2014**, *70*, 5–12.
- (163) Zarco-Fernández, S.; Mancheño, M. J.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. A new specific polymeric material for mercury speciation: Application to environmental and food samples. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *897*, 109–115.
- (164) Zhang, B.; Xu, P.; Qiu, Y.; Yu, Q.; Ma, J.; Wu, H.; Luo, G.; Xu, M.; Yao, H. Increasing oxygen functional groups of activated carbon with non-thermal plasma to enhance mercury removal efficiency for flue gases. *Chem. Eng. J.* **2015**, *263*, 1–8.
- (165) Liu, Y.; Bisson, T. M.; Yang, H.; Xu, Z. Recent developments in novel sorbents for flue gas clean up. *Fuel Process. Technol.* **2010**, *91*, 1175–1197.
- (166) Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *954*, 5–32.

- (167) El-Safty, S. a.; Shenashen, M. a. Mercury-ion optical sensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *38*, 98–115.
- (168) Sener, G.; Uzun, L.; Denizli, A. Lysine-promoted colorimetric response of gold nanoparticles: a simple assay for ultrasensitive mercury(II) detection. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 514–520.
- (169) Liu, B.; Huang, Y.; Zhu, X.; Hao, Y.; Ding, Y.; Wei, W.; Wang, Q.; Qu, P.; Xu, M. Smart lanthanide coordination polymer fluorescence probe for mercury(II) determination. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *912*, 139–145.
- (170) Choi, J. Y.; Kim, W.; Yoon, J. Rhodamine based fluorescent chemosensors for Hg²⁺ and its biological application. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 2359–2364.
- (171) Shirzadmehr, A.; Afkhami, A.; Madrakian, T. A new nano-composite potentiometric sensor containing an Hg²⁺-ion imprinted polymer for the trace determination of mercury ions in different matrices. *J. Mol. Liq.* **2015**, *204*, 227–235.
- (172) Li, Z.; Miao, X.; Xing, K.; Peng, X.; Zhu, A.; Ling, L. Ultrasensitive electrochemical sensor for Hg²⁺ by using hybridization chain reaction coupled with Ag at Au core-shell nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 339–343.

CAPITULO 3: BIOCONCENTRACIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN MODELOS “IN VIVO”

3.1. BIODISPONIBILIDAD DE UNA SUSTANCIA QUÍMICA

La biodisponibilidad de una sustancia o compuesto químico se define como el grado en el cual la sustancia o compuesto puede ser absorbido en el sistema de un organismo. En el medio ambiente está relacionada con la concentración en la que se encuentran en el medio, con los factores físico-químicos ambientales y con su toxicidad. Se han descrito tres conceptos en referencia a la biodisponibilidad: bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación^{1,2}.

3.1.1. Bioacumulación

La bioacumulación es la captación y acumulación de sustancias químicas por organismos vivos de los distintos compartimentos ambientales, (agua, aire, suelo) y/o a través de los alimentos. Esta acumulación puede ocurrir por dos vías, bien a través de fuentes abióticas, como la salinidad, la temperatura o el pH, el carácter hidrofóbico y lipófilo, resistencia a la degradación, o mediante fuentes bióticas, presencia de otros seres vivos³. Las consecuencias de bioacumulación en organismos vivos son⁴:

- Puede suponer una ventaja selectiva para las especies, pudiendo constituir una estrategia fundamental en los procesos evolutivos, actuando como una fuerza impulsiva entre especies competidoras, como por ejemplo, en situaciones de recursos limitados.
- Pueden producirse efectos transitorios, como la activación de sistemas de desintoxicación tras la activación de enzimas y/o del metabolismo, provocando la biotransformación, la inactivación o la depuración.
- Puede producirse la bioacumulación en órganos y tejidos, induciendo efectos agudos, subagudos o crónicos a largo plazo en individuos, poblaciones, especies y/o ecosistemas.

El nivel de bioacumulación se puede establecer mediante el *Factor de Bioacumulación* (BAF), siendo la relación de la concentración alcanzada en el organismo bajo la condición de estado estacionario y la concentración en el medio que le rodea⁵.

3.1.2. Bioconcentración

La bioconcentración es el proceso por el cual una sustancia química es absorbida por el organismo a través del sistema respiratorio y de la dermis, quedando excluida la ingestión por medio de la dieta. Esta acumulación supone la diferencia entre la absorción de la sustancia química y su eliminación del organismo, incluyendo la biotransformación metabólica^{3,4}. El *Factor de Bioconcentración* (BCF) se emplea para expresar su extensión y conocer el valor de la acumulación de un contaminante químico en los tejidos de peces u otros organismos. Se calcula o define como la relación entre la concentración de la sustancia o compuesto en el organismo y la concentración de la misma en el medio circundante.

Las rutas de absorción de las sustancias o compuestos químicos pueden verse en la figura 3.1. La incorporación puede producirse por varias vías: las branquias, la piel o su ingestión en forma de partículas. Cuando penetran al interior pueden suceder distintos procesos: eliminación fecal, transformaciones metabólicas formando otro tipo de compuestos, o r una dilución por crecimiento del organismo.

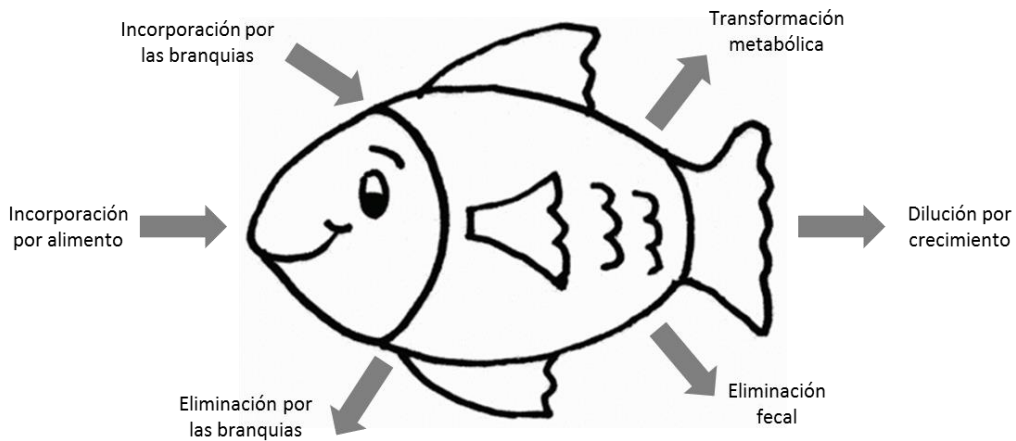


Figura 3.1: Rutas principales de absorción y eliminación de sustancias químicas en peces para estimación de BCF y BAF⁴.

3.1.3. Biomagnificación

La biomagnificación se define como el proceso de bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, produciéndose la transferencia de la sustancia química desde el alimento al organismo. Si la concentración encontrada en dicho organismo aumenta cuando es comparada con la fuente de origen, se da un incremento en la concentración entre los distintos niveles tróficos⁶. Lo más frecuente es que la transferencia de esta sustancia o de sus metabolitos a niveles tróficos superiores, causen efectos tóxicos a largo plazo, debido al aumento gradual de la concentración,

en el caso que no existan rutas metabólicas para su depuración y eliminación⁵. La biomagnificación puede expresarse a través de un *Factor de Biomagnificación* (BMF), que relaciona la concentración de la sustancia química en el organismo y la del alimento.

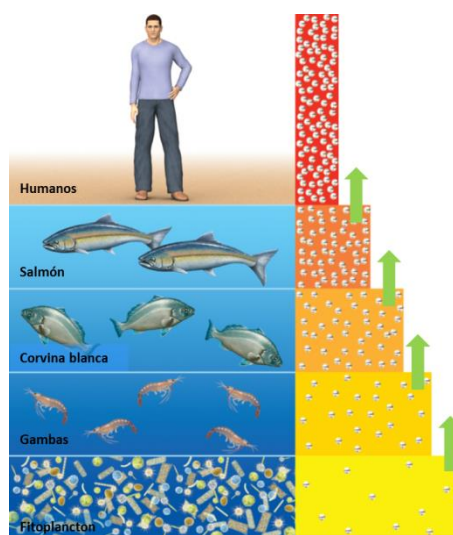


Figura 3.2: Biomagnificación de una sustancia química en la cadena trófica⁷

Los experimentos para evaluar estos procesos deben ser realizados primeramente en laboratorios bajo control exhaustivo de las condiciones ambientales. Uno de los protocolos más empleados en este tipo de estudios es el Test 305 de la OECD, el cual emplea peces como modelo vivo.⁸

3.2. TEST OECD 305

El Test OECD 305⁸ es una Guía de ensayo que describe un procedimiento para evaluar el potencial de bioacumulación o bioconcentración de sustancias químicas en peces tras una exposición alimentaria o en medio acuoso, bajo unas condiciones de flujo continuo controladas. El procedimiento a llevar a cabo es independiente del método de exposición seleccionado, bioacumulación o bioconcentración. La prueba de ensayo se desarrolla en dos fases. En primer lugar, se lleva a cabo la exposición de los peces a las sustancias químicas, *fase de absorción*, y en segundo lugar, se trata de una post-exposición, *fase de depuración*. En la etapa de absorción los peces están expuestos a las sustancias durante 28 días, pudiéndose ampliar hasta un máximo de 60 días, para asegurar que se alcanza el estado estacionario. La etapa de depuración tiene una duración estimada de la mitad del tiempo empleada en la absorción; en esta fase los peces deben estar en un medio libre de la sustancia de ensayo. En paralelo, se realizan

los mismos ensayos para un grupo de peces control, pero sin estar expuestos a la sustancia química del ensayo. El experimento requiere un control de determinados parámetros para garantizar los resultados obtenidos. Estos parámetros son el oxígeno disuelto, el pH, la dureza del agua, la salinidad y la temperatura. El Test propone la exposición a dos niveles distintos de concentración seleccionados en base al LC_{50} , concentración que resulta letal para el 50% de la población tras 96 horas de exposición. De este modo, las concentraciones serán el 1% y 0.1% del valor del LC_{50} obtenido. Estas concentraciones requieren un control estricto, debiéndose mantener constantes a lo largo del ensayo para garantizar óptimos resultados durante el experimento.

Los estudios de bioconcentración en el medio acuoso estiman el balance entre la asimilación y la eliminación de las sustancias químicas, no teniendo en cuenta las posibles rutas de biodegradación. Estos procesos están caracterizados por tasas constantes de absorción y depuración, y están definidos por cinéticas de primer orden. Cuando no se alcanza el estado estacionario el cálculo del BCF se puede obtener empleando un modelo de dos compartimentos, medio acuoso-organismo acuático, mediante el proceso:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f \quad [1] \quad \frac{dC_f}{dt} = -k_2 \cdot C_f \quad [2]$$

Donde C_f es la concentración en el organismo expresada en ng/g, C_w es la concentración en el medio de exposición en (ng/mL). Los parámetros k_1 (L/Kg.h) y k_2 (h^{-1}) son constantes de primer orden de absorción y depuración. Si consideramos la concentración en el medio constante durante el tiempo obtenemos la siguiente ecuación:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [3] \quad C_f = C_{f,0} e^{-k_2 t} \quad [4]$$

Donde $C_{f,0}$ es la concentración del compuesto químico cuando empieza la etapa de depuración; k_1 y k_2 se obtienen si los valores experimentales de la concentración se ajustan a la ecuación.

Si se alcanza el estado estacionario y por lo tanto el equilibrio, la ecuación puede simplificarse quedando de la siguiente forma:

$$\frac{C_f}{C_w} = BCF_K = \frac{k_1}{k_2} \quad [5]$$

donde ahora BCF_k es el factor de bioconcentración cinético y, tal y como refleja la ecuación [5], representa la relación entre la tasa de absorción y la tasa de depuración^{9,10}.

3.3. ORGANISMOS BIOLÓGICOS COMO MODELOS

Los organismos biológicos modelo son aquellas especies que han sido previamente estudiadas con el fin de obtener conclusiones que puedan generalizarse a otras especies. Estos modelos sólo representan una pequeña fracción de la biodiversidad, asumiendo que sus resultados pueden ser extrapolables al resto de organismos, considerando un origen común de las especies. Los sistemas modelo reúnen características que facilitan tanto su mantenimiento como la manipulación en el laboratorio, obteniendo los resultados en tiempos razonables. Además, se caracterizan por tener ciclos cortos de vida, pequeño tamaño, facilidad de reproducción y bajo coste, siendo conveniente que tanto la morfología como su genoma sean simples, para facilitar la interpretación de los resultados¹¹.

Los organismos modelo utilizados más ampliamente quedan resumidos en la figura 3.3.¹²

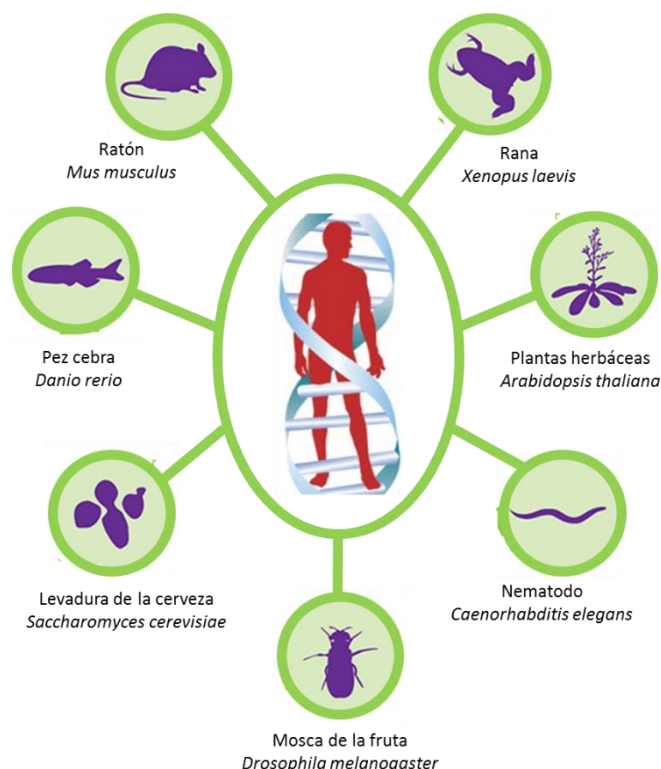


Figura 3.3: Organismos modelo típicos para estudios experimentales¹³

De todos los organismos modelo disponibles, en esta tesis se han utilizado *Arabidopsis thaliana* y *Danio rerio*.

3.3.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea de pequeño tamaño y ciclo anual. El apelativo de *thaliana* se debe a la persona que realizó la primera descripción botánica, Johanner Tahl en el siglo XVI. Está emparentada con un amplio abanico de especies de interés comercial: col (*Brassicaoleracea*), nabo (*Brassicinapus*), rábano (*Raphanussativus*), mostaza (*Brassicacampestris*), mostaza blanca (*Sinapis alba*) o negra (*Brassicanigra*), y con la rúcula (*Erucavesicaria*). Pero no fue hasta 1980 cuando se fomentó el uso de la *Arabidopsis thaliana* como modelo en el desarrollo vegetal^{14,15}. A mediados de la década de los 60, la comunidad científica creó el Arabidopsis Information Service, organizándose poco después en 1965 el primer simposio sobre *Arabidopsis thaliana*. En la actualidad, este servicio ha pasado a llamarse “The Arabidopsis Information Resource”, ofreciendo una base de datos de genética y de biología molecular para *Arabidopsis thaliana*. Estos datos incluyen la secuencia completa del genoma, junto con la estructura de genes, la información producto del gen, la expresión génica, mapas del genoma, marcadores genéticos y físicos, incluyendo las publicaciones relacionadas con este modelo¹⁶. En la actualidad se ha convertido en la planta modelo por excelencia, considerada por muchos como la “Drosophila vegetal”¹⁵.



Figura 3.4: *Arabidopsis thaliana*¹⁷

- Características como sistema modelo

Las características más destacadas para su aplicación como organismo modelo son^{15,18}: Crecimiento bajo condiciones controladas; pequeño tamaño, unos 30 cm de altura, permitiendo cultivar hasta 10.000 plantas por m²; ciclo de vida corto, unas 6 semanas, obteniendo hasta 8 generaciones al año. Las semillas pueden almacenarse durante varios años a temperatura ambiente, con escasa pérdida de su viabilidad. El número de genes descritos aproximadamente en *Arabidopsis thaliana* es de 25.498, acercándose en gran medida, a las primeras estimaciones de 30.000 genes para la especie humana¹⁹. Se ha asignado el 69% basándose en la similitud secuencial que presenta

con otros genes de otros organismos, un 9% han sido caracterizados experimentalmente, quedando aun 30% sin clasificar²⁰.

Las líneas más destacadas de investigación que se llevan a cabo con este modelo son:

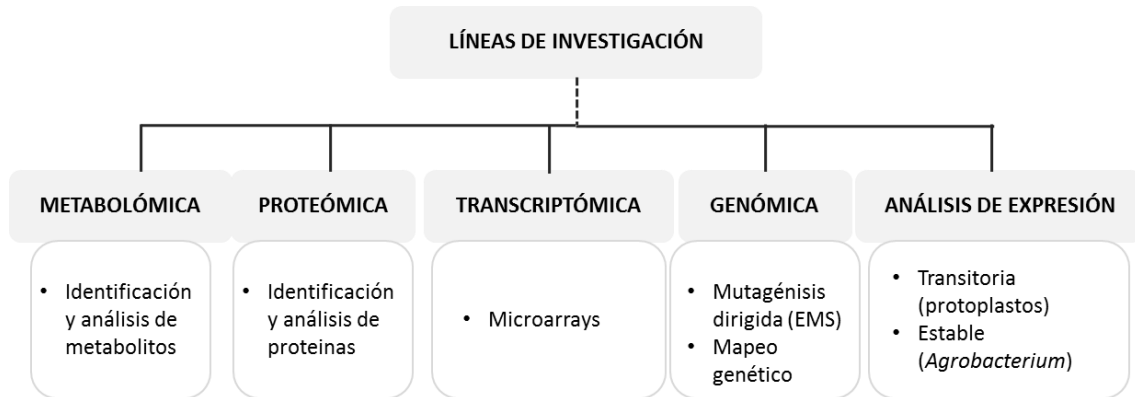


Figura 3.5: Principales líneas de investigación empleando *Arabidopsis thaliana*²¹

○ Transformaciones genéticas: Plantas transgénicas

Se denominan organismos *transgénicos* aquéllos a los cuales se les han introducido uno o más genes provenientes de otra especie. *Plantas transgénicas* son aquellas que poseen genes de varias procedencias: otras plantas, animales, bacterias, virus y en ocasiones combinaciones de ellas mismas. Estos genes transfieren y expresan para conferir a las plantas características puntuales, como la resistencia a productos químicos, a condiciones ambientales adversas o a insectos, entre otros. En general, la expresión de estos genes se realiza de manera constitutiva en todos los tejidos de la planta utilizando el promotor 35S que proviene de virus vegetales. Actualmente, existe una amplia variedad de promotores que permiten expresar genes de una manera precisa en determinados tejidos vegetales o en respuesta a distintos estímulos^{22,23}.

La obtención de una planta transgénica se puede resumir en dos etapas fundamentales: transformación y regeneración. En la transformación se inserta el gen en el genoma de una célula, y la regeneración es la obtención de la planta completa tras la inserción del gen. Hay distintas formas de introducir el gen en la célula, pero los más habituales son dos: el empleo de una bacteria del suelo, *Agrobacterium*, que en condiciones naturales es capaz de realizar la transferencia de genes, o la introducción directa de los genes al núcleo de la célula. Esto se lleva a cabo con técnicas que disparan a las células microproyectiles metálicos cubiertos de ADN, penetrando en el interior de las mismas. La regeneración de la planta se realizaría a partir de esta transferencia de genes^{24,25}. Actualmente, *Arabidopsis* se puede transformar de una manera mucho más sencilla mediante infiltración de las plantas de cultivo de *Agrobacterium*²⁶.

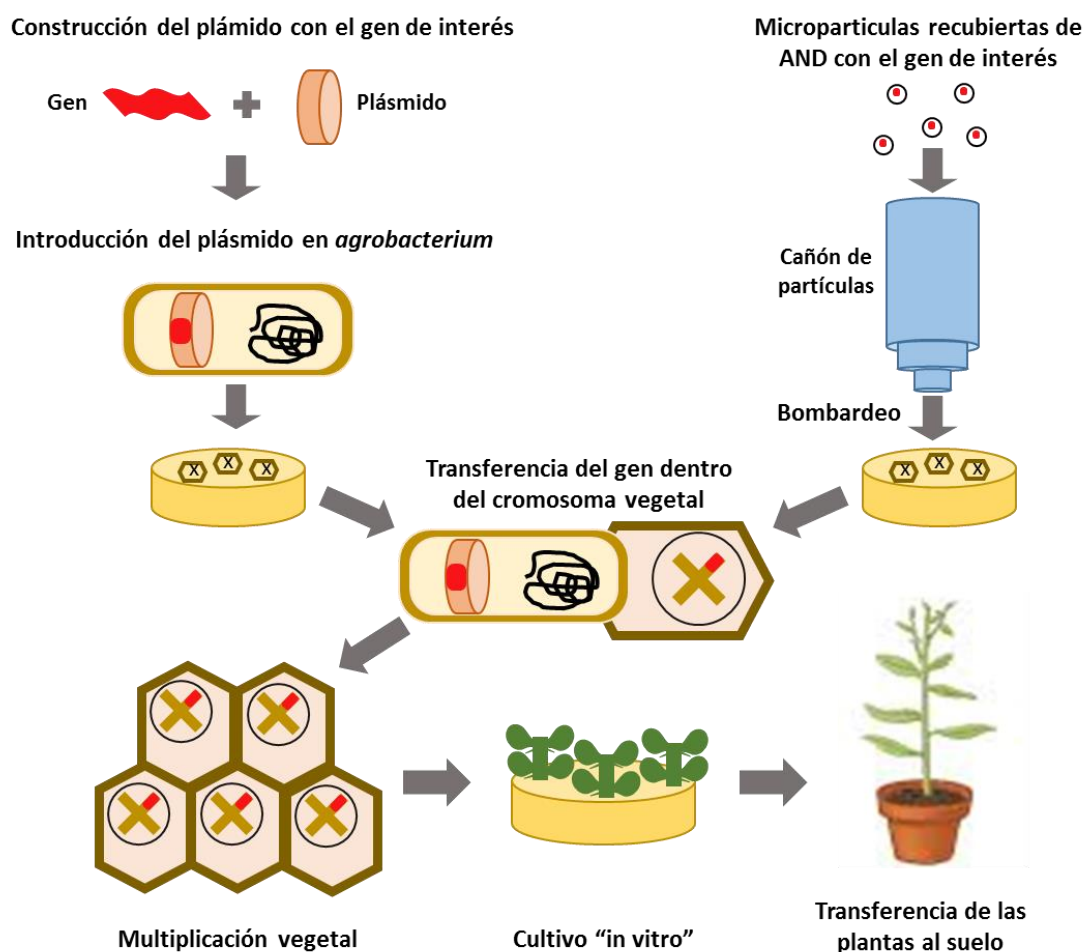


Figura 3.6: Obtención de plantas transgénicas (adaptación ref. 27)²⁷

El motivo que nos ha llevado a emplear plantas transgénicas de la *Arabidopsis thaliana* en el presente trabajo es determinar un valor de máxima tolerancia a metales biodisponibles y, más concretamente, hacia el arsénico. Este valor supone el punto de inflexión a partir del cual comienzan a manifestarse síntomas de toxicidad que a nivel celular suponen el bloqueo de grupos funcionales, el desplazamiento o sustitución de iones esenciales, llegando a la desnaturalización de enzimas y a la destrucción de la integridad de orgánulos²⁸.

La tolerancia a determinados metales de una planta está directamente relacionada con su capacidad de acumulación. Existe de hecho una clasificación en función de la mayor o menor acumulación de metales que presentan las plantas^{29,30}.

- Excluyentes: Son aquellas que presentan una acumulación restringida o tienen limitada la translocación del metal biodisponible
- Indicadoras: En este caso, tanto la acumulación como la translocación son un reflejo de la concentración de metales en el suelo.

- Acumuladoras: Son aquéllas que tienen la capacidad de concentrar metales biodisponibles en sus tejidos. Generalmente, la acumulación observada es debida sólo a un metal y no a mezcla de metales.

La aplicación de plantas acumuladoras para la fitorremediación de suelos es una práctica ampliamente estudiada en la actualidad. Las plantas utilizadas presentan una serie de mecanismos a nivel celular que están implicados en la desintoxicación, y, por tanto, en la tolerancia a metales pesados y metaloides mediante la formación de quelatos entre el metal y grupos tioles. Las fitoquelatinas (PCs) son los principales péptidos con grupos tioles que forman los quelatos en el citoplasma vegetal. Son pequeños oligopéptidos sintetizados a partir del Glutatión (GSH) mediante la enzima fitoquelatina sintasa en respuesta a estrés por metales. Todas las respuestas conservan un dominio N terminal, responsable de la actividad catalítica de la enzima y un dominio C-terminal variable que actúa como sensor de metales, mayoritariamente con el cadmio, arsénico y mercurio. Las PCs forman un complejo de elevada estabilidad con el metal, secuestrándolo y transportándolo hacia las vacuolas³¹.

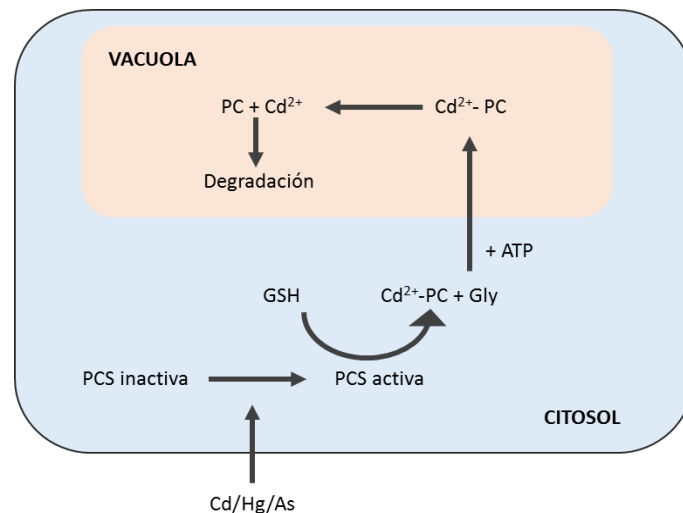


Figura 3.7: Representación del mecanismo de desintoxicación de las PCs (adaptación ref 32)³²

Con el objetivo de obtener plantas con mayor tolerancia frente a metales o metaloides, mediante modificaciones transgénicas variando los niveles de PCs endógenas, se ha empleado la *Arabidopsis thaliana*, ya que en estudios previos se ha demostrado que en mutantes de *Arabidopsis* con niveles deficientes en PCs son más sensibles a metales como el Cd, As y Hg^{32,33}. Se ha verificado de este modo el incremento en el valor de la tolerancia observado, tras ser expuestas a estos metales. Marcus Schmöger³¹ realizó estudios para comprobar la capacidad de formar complejos y en consecuencia, la capacidad de desintoxicación del As con las PCs. Estos estudios fueron comparados con lo que sucedía con el Cd, observando comportamientos

similares. Basándose en el incremento del fenotipo de tolerancia debido a la presencia de estos compuestos se han realizado ensayos de sobre-expresión de genes implicados en la síntesis de PCs, potenciando así su unión con el Cd y As. Esto permite estudiar la compartimentación vacuolar y los posibles mecanismos de desintoxicación que tienen lugar^{34,35}. La tolerancia de la *Arabidopsis* hacia el mercurio se consigue incorporando el gen merE de bacterias que codifica a un transportador de mercurio regulando el transporte de CH₃Hg⁺ e iones de mercurio a través de membranas citoplasmáticas bacterianas. Constituye una herramienta molecular para incrementar la eficiencia de la fitorremediación. La sobreexpresión de este gen consigue incrementar la tolerancia hacia el mercurio en las plantas, favoreciendo su capacidad de acumulación y consecuentemente su capacidad de detoxificación^{36,37}. Generalmente, las PCs se asocian con la desintoxicación de metales no esenciales, pero se ha demostrado que también está ligado a iones esenciales como el Zn²⁺, regulando de este modo la concentración de metal libre en la célula^{38,39}. En el caso del arsénico las PCs juegan un papel esencial; la forma química que se compleja con las PCs es la forma reducida, arsenito, mientras que la forma más abundante es el arseniato. Por tanto la actividad de las enzimas arseniato reductasas son esenciales para la tolerancia al arsénico.

Estos estudios tratan de dilucidar las posibles rutas de captación, transformación y/o acumulación del arsénico hacia el interior de las plantas. Nuestros ensayos en el contexto de este trabajo se han centrado en la caracterización funcional de una nueva arseniato reductasa, y del papel de las citoquininas en el incremento de la acumulación de arsénico en plantas.

3.3.2. Pez cebra (*Danio rerio*)

Danio rerio es un pez tropical de agua dulce, de pequeño tamaño (unos 5 cm). Puede encontrarse en los ríos de Asia Central, como en la región del Ganges; en los ríos de Nepal, Bangladesh y Pakistán. Pertenece a la familia de los ciprínidos (*Cyprinidae*), estando emparentado con las carpas y los barbos. El pez cebra se ha convertido en un organismo modelo gracias a George Streinsinger, que en la década de los 70 empleó el pez cebra para estudios relacionados con el desarrollo biológico y el sistema nervioso⁴⁰. A partir de ahí, se convirtió en uno de los modelos biológicos más importantes en el campo de la biología y la genética en la década de los 80 y 90. En nuestros días, sigue siendo ampliamente utilizado.



Figura 3.8: *Danio rerio*⁴¹

○ Características como sistema modelo

La elección de este organismo como sistema modelo se debe a sus ventajas⁴²⁻⁴⁴: son organismos que cuando alcanzan su etapa adulta no superan los 5 cm, permitiendo de este modo su crianza en grandes cantidades a un coste moderado; poseen una elevada capacidad de reproducción, ya que una hembra puede poner cientos de huevos a la semana, al carecer de reproducción estacionaria; la fecundación y el desarrollo embrionario son externos, permitiendo la manipulación del embrión para posibles modificaciones genéticas; el desarrollo embrionario dura 72 h, alcanzando la madurez sexual a los 3-4 meses; el embrión es transparente, permitiendo una fácil observación de sus tejidos lo cuales se desarrollan en un solo día. La similitud entre su genoma y el genoma humano se estima superior al 80 %⁴⁵.

Los campos de aplicación en los que se han realizado investigaciones con el pez cebrase resumen en la Figura 3.9.^{46,47}

- Biología del desarrollo: debido a los tiempos cortos de generación, su alta prolificidad, rápido desarrollo embrionario y la transparencia de los embriones, el pez cebrase ha consolidado como modelo en el campo de la Biología del Desarrollo.
- Farmacología y biomedicina: dada su elevada similitud con el genoma humano, es ampliamente utilizado en la investigación de diversas patologías y enfermedades humanas. Puede experimentar la acumulación de mutaciones sin que se produzca la muerte del embrión, no siendo posible realizarlo en otros modelos, como los ratones. Por ello, este modelo constituye una herramienta muy importante para la investigación de nuevos fármacos^{44,46,47}.
- Toxicología ambiental: la gran capacidad de reproducción y el rápido desarrollo embrionario, hacen posible su aplicación en este campo. Esta aplicación está relacionada con la contaminación medioambiental, mediante el estudio de los efectos de los contaminantes y los residuos tóxicos, tras su exposición y bioacumulación⁴⁸ (buscar cualquier referencia) o mediante la búsqueda de bioindicadores para la detección de compuestos tóxicos y/o perjudiciales^{42,49}.

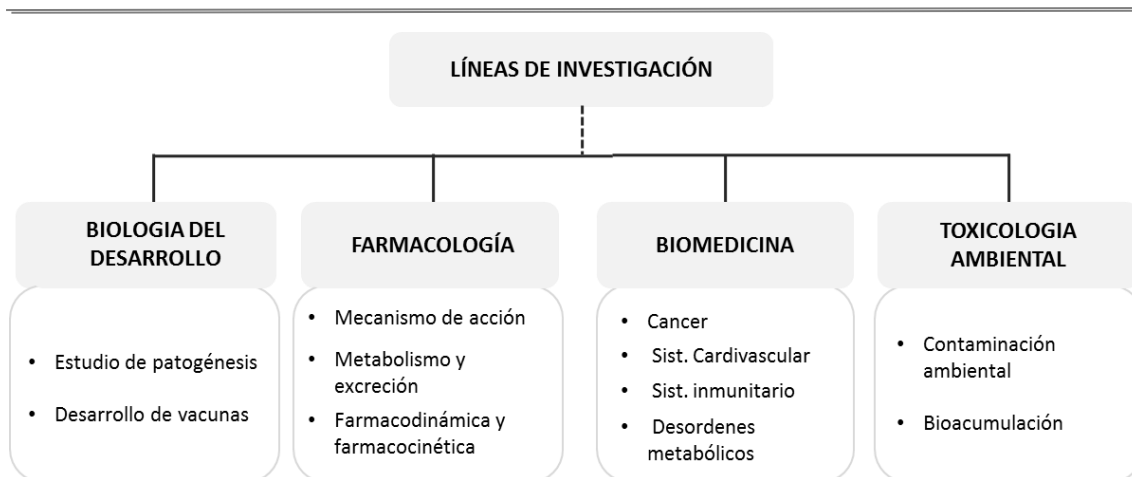


Figura 3.9: Campos de investigación del pez cebra⁴⁷

El uso del pez cebra en estudios de bioacumulación de metales dentro del campo de la toxicología ambiental permite predecir los efectos que estos metales provocarían en los organismos por distintas vías. La exposición a los analitos de interés proporciona información de su posible acumulación dentro del organismo, como es el caso del metilmercurio, que se ha observado su acumulación en el tracto digestivo⁴⁸. Otros estudios se centran en las posibles vías de eliminación o desintoxicación. En el caso del mercurio se han llevado a cabo exposiciones a CH_3Hg^+ con compuestos de selenio para reducir la bioacumulación del mercurio^{50,51}. Hay autores que exponen al pez cebra a mezclas de metales para poder vaticinar posibles rutas metabólicas de bioacumulación cuando son expuestos a Cd, Pb y Cu⁵². Los contaminantes emergentes, como las nanopartículas, también están presentes en este tipo de estudios. Las exposiciones a diferentes nanopartículas en este organismo y en otros como la *Daphnia magna* o *Lymnaea stagnalis* pueden ayudar a comprender la posible toxicidad que presentan estos nuevos contaminantes en los seres vivos⁵³⁻⁵⁵.

Nuestro grupo de investigación ha centrado una parte importante de su investigación al estudio de la bioacumulación de metales y compuestos orgánicos en el pez cebra. Todos estos ensayos han sido planteados como una propuesta alternativa al Test de la OECD 305. Esta opción se lleva a cabo con larvas o eleuteroembriones, no siendo necesario emplear peces adultos, lo que implica disminución de costes y de tiempo para desarrollar los experimentos. La parte de la bioacumulación dedicada a los metales se focaliza en el cálculo de los BFC de aquellos metales que suponen un riesgo para la población, como el Hg, Ag, As, o el Cd. Y continuando con la tendencia generalizada, también se han desarrollado ensayos con nanopartículas de Ag y Ti. En la siguiente tabla se muestran los BCF obtenidos experimentalmente utilizando nuestro protocolo, comparados con los valores teóricos obtenidos por las web METI-NITE y el EPI.

		Japan METI-NITE data ⁵⁶		EPI suite ⁵⁷	NUESTRO MÉTODO		
Compuesto	CAS no.	µg/L	BCF	BCF	µg/L	BCF	Ref
Na ₂ SeO ₃	10102-18-8	10	<8,1-10	3,16	11,3	68	51
		1	<85		1,12	354	
CdCl ₂	10108-64-2	10	310	3,16	13,3	350	58
		1	620		2,2	666	
As ₂ O ₃ -H ₂ O	1327-53-3	50	<4	3,16	44,7	2,2	9
		5	<38		5,4	8,6	
AgNO ₃	7761-88-8	0,4	460	3,16	0,06	233	59
		0,04	250		0,011	666	
TiO ₂	7440-32-6	2	<1,1-9,6	3,16	0,9	3,3	60
		0,2	<10		0,11	77	
CH ₃ Hg	115-09-3	10	595-3000	100	6,69	2333	10
		0,1	4844		0,31	5000	

Tabla 3.1: Comparación de los BCF teóricos y BCF experimentales⁶¹

Con los resultados obtenidos hasta el momento, podemos considerar que nuestro protocolo es una primera aproximación de gran relevancia para el cálculo de BCF utilizando larvas del pez cebra en lugar de peces adultos. En base a estos resultados, una parte del desarrollo experimental de esta tesis ha sido evaluar cómo se ve afectada la bioacumulación de los metales estudiados individualmente, cuando las larvas son expuestas a una mezcla de elementos, así como la capacidad de bioacumulación cuando las exponemos a nanopartículas de QDs, comparando su comportamiento con el observado para el cadmio iónico.

3.4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Maggi, C.; Berducci, M. T.; Bianchi, J.; Giani, M.; Campanella, L. Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *641*, 32–36.
- (2) Manahan, S. E. Química ambiental de la hidrosfera. In *Introducción a la química ambiental*. Ed Reverte S.A.; **2007**; pp. 90–91.
- (3) Hall, J. Bioconcentration, bioaccumulation, and biomagnification in Puget Sound biota: assessing the ecological risk of chemical contaminants in Puget Sound. *Univ. Washingt. Tacoma* **2002**, 1–19.
- (4) Arnot, J. A.; Gobas, F. A. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* **2006**, *14*, 257–297.
- (5) Beek, B.; Böhling, S.; Bruckmann, U.; Franke, C.; Jöhncke, U.; Studinger, G. The Assessment of Bioaccumulation. *Handb. Environ. Chem. Vol. 2 Part J Bioaccumulation* **2000**, *2*, 239–273.
- (6) Gray, J. S. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *45*, 46–52.
- (7) Fisher, R. J. [nationalgeographic.org/Health Concerns for People and Wildlife](http://nationalgeographic.org/Health_Concerns_for_People_and_Wildlife).
- (8) *Test OECD 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure*; **2012**.
- (9) López-Serrano Oliver, A.; Sanz-Landaluze, J.; Muñoz-Olivas, R.; Guinea, J.; Cámara, C. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. *Water Res.* **2011**, *45*, 6515–6524.
- (10) Cuello, S.; Sanz-Landaluze, J.; Madrid, Y.; Guinea, J.; Cámara, C. Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model. *Talanta* **2012**, *89*, 169–177.
- (11) Bolker, J. A. Model systems in developmental biology. *Bioessays* **1995**, *17*, 451–455.
- (12) Hedges, S. B. The origin and evolution of model organisms. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 838–849.
- (13) Model organisms: Powerful tools to study biology <https://biology.uiowa.edu/model-organisms>.
- (14) Meyerowitz, E. M. Arabidopsis, a useful weed. *Cell* **1989**, *56*, 263–269.
- (15) Page, D. R.; Grossniklaus, U. The art and design of genetic screens: Arabidopsis thaliana. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 124–136.
- (16) www.arabidopsis.org.
- (17) <http://www.discoverlife.org/Arabidopsis+thaliana>.
- (18) Bowman, J. L. *Arabidopsis. An atlas of morphology and development*. Springer Verlag, New York; **1994**.
- (19) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860–921.

- (20) The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, *408*, 798–815.
- (21) Cuesta, C.; Cires, E. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en Biología. *Bol. Cien. Nat, RIDEA* **2012**, *52*, 175–178.
- (22) Daniell, H.; Streatfield, S. J.; Wycoff, K. Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 219.
- (23) Twyman, R. M.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P.; Fischer, R. Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 570–578.
- (24) Obembe, O. O.; Popoola, J. O.; Leelavathi, S.; Reddy, S. V. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 210–222.
- (25) Imamura, T.; Sekine, K.-T.; Yamashita, T.; Kusano, H.; Shimada, H. Production of recombinant thanatin in watery rice seeds that lack an accumulation of storage starch and proteins. *J. Biotechnol.* **2016**, *219*, 28–33.
- (26) Clough, S. J.; Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **1998**, *16*, 735–743.
- (27) Chrispeels, M. J.; Sadava, D. E. *Plants, Genes, and Crop Biotechnology*; Jones and Bartlett Publisher, **2003**.
- (28) Maestri, E.; Marmiroli, N. Transgenic Plants for phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* **2011**, *13*, 264–279.
- (29) Vangronsveld, J.; Herzig, R.; Weyens, N.; Boulet, J.; Adriaensen, K.; Ruttens, A.; Thewys, T.; Vassilev, A.; Meers, E.; Nehnevajova, E.; et al. Phytoremediation fo contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Env. Sci Pollut Res* **2009**, *16*, 765–794.
- (30) Kabata-Pendias, A. Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma* **2004**, *122*, 143–149.
- (31) Schmöger, M. E.; Oven, M.; Grill, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 793–801.
- (32) Hall, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1–11.
- (33) Howden, R.; Andersen, C.; Goldsbrough, P.; Cobbett, C. Cadmium Sensitive, *cad1* Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 105–1066.
- (34) Guo, J.; Dai, X.; Xu, W.; Ma, M. Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1020–1026.
- (35) Guo, J.; Xu, W.; Ma, M. The assembly of metals chelation by thiols and vacuolar compartmentalization conferred increased tolerance to and accumulation of cadmium and arsenic in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *199–200*, 309–313.
- (36) Hsieh, J.; Chen, C.; Chiu, M.; Chein, M.; Chang, J.; Endo, G.; Huang, C. Expressing

- a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals. *J. Hazard Mater* **2006**, *161*, 920–925.
- (37) Sone, Y.; Nakamura, R.; Pan-Hou, H.; Sato, M. H.; Itoh, T.; Kiyono, M. Increase methylmercury accumulation in *Arabidopsis thaliana* expressing bacterial broad-spectrum mercury transporter MerE. *AMB Express* **2013**, *3*, 52.
- (38) Clemens, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **2006**, *88*, 1707–1719.
- (39) Nishida, S.; Kato, A.; Tsuzuki, C.; Yoshida, J.; Mizuno, T. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 9420–9430.
- (40) Streisinger, G.; Singer, F.; Walker, C.; Knauber, D.; Dower, N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics* **1986**, *112*, 311–319.
- (41) <http://www.agenciasinc.es/Noticias/El-genoma-del-pecebra-lo-impulsa-como-modelo-para-estudiar-enfermedades>.
- (42) Aleström, P.; Holter, J. L.; Nourizadeh-Lillabadi, R. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 15–21.
- (43) Gerlai, R. Zebrafish: An uncharted behavior genetic model. *Behav. Genet.* **2003**, *33*, 1–8.
- (44) Kalueff, A. V.; Stewart, A. M.; Gerlai, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 63–75.
- (45) Barbazuk W. B.; Korf, I.; C, K.; Heyen, J.; Tate, S.; Wun, E.; A., B. J.; D., M. J.; L, J. S. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1351–1358.
- (46) Bopp, S.; Minuzzo, M.; Lettieri, T. *EUR 22598 EN: The zebrafish (Danio rerio): an emerging model organism in the environmental field; 2006.*
- (47) Miana, A. B.; Izpis, J. C. El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investig. Cienc.* **2007**, 62–69.
- (48) Korbas, M.; Blechinger, S. R.; Krone, P. H.; Pickering, I. J.; George, G. N. Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 12108–12112.
- (49) Meguro, S.; Hasumura, T.; Hase, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–13.
- (50) Yamashita, M.; Yamashita, Y.; Suzuki, T.; Kani, Y.; Mizusawa, N.; Imamura, S.; Takemoto, K.; Hara, T.; Hossain, M. A.; Yabu, T.; et al. Selenoneine, a Novel Selenium-Containing Compound, Mediates Detoxification Mechanisms against Methylmercury Accumulation and Toxicity in Zebrafish Embryo. *Mar. Biotechnol.* **2013**, *15*, 559–570.
- (51) Cuello, S.; Sanz-Landaluze, J.; Madrid, Y.; Guinea, J.; Cámara, C. Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model. *Talanta* **2012**, *89*, 169–177.

- (52) Gao, Y.; Feng, J.; Han, F.; Zhu, L. Application of biotic ligand and toxicokinetic-toxicodynamic modeling to predict the accumulation and toxicity of metal mixtures to zebrafish larvae. *Environ. Pollut.* **2016**, *213*, 16–29.
- (53) Oliver, A. L. S.; Croteau, M. N.; Stoiber, T. L.; Tejamaya, M.; Römer, I.; Lead, J. R.; Luoma, S. N. Does water chemistry affect the dietary uptake and toxicity of silver nanoparticles by the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*? *Environ. Pollut.* **2014**, *189*, 87–91.
- (54) Zhao, C.; Wang, W. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7699–7704.
- (55) Griffitt, R. J.; Lavelle, C. M.; Kane, A. S.; Denslow, N. D.; Barber, D. S. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2013**, *130–131*, 192–200.
- (56) METI-NITE Biodegradation and bioconcentration database of the existing chemical substances. <http://www.safe.nite.go.jp>. http://www.safe.nite.go.jp/english/kizon/KIZON_start_hazkizon.html.
- (57) Estimation program interface (EPI). In EPAsOffice of Pollution Prevention Toxics and Syracuse Research Corporation (SRC). <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>.
- (58) Zarco-Fernández, S.; Coto-García, a. M.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz-Landaluze, J.; Rainieri, S.; Cámara, C. Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae. *Chemosphere* **2016**, *148*, 328–335.
- (59) López-Serrano, A.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz-Landaluze, J.; Olasagasti, M.; Rainieri, S.; Cámara, C. Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Environ. Pollut.* **2014**, *191*, 207–214.
- (60) López-Serrano Oliver, A.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz Landaluze, J.; Rainieri, S.; Cámara, C. Bioaccumulation of ionic titanium and titanium dioxide nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Nanotoxicology* **2014**, *5390*, 1–8.
- (61) Sanz-Landaluze, J.; Pena-Abaurrea, M.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C.; Ramos, L. Zebrafish (*danio rerio*) eleutheroembryo-based procedure for assessing bioaccumulation. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 1860–1869.

NUEVOS MATERIALES PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de nuevos materiales con alta afinidad hacia el mercurio y sus especies, con el fin de obtener rellenos cromatográficos para la separación de sus especies mediante acoplamiento con ICP-MS, o bien como relleno en cartuchos de SPE para retención y posterior elución consiguiendo extractos más limpios y factores de pre-concentración, necesarios en muchos casos. Estos materiales, en su mayoría, se obtienen mediante impresión molecular, lo que implica el contacto directo con el mercurio para poder obtener los huecos específicos. Tras la polimerización es necesario realizar una limpieza exhaustiva, para lograr eliminar la máxima cantidad de mercurio posible, siendo complicado garantizar su completa limpieza y que no se den fenómenos de sangrado durante los análisis (“bleeding”).

En los siguientes trabajos se presenta la síntesis de nuevos materiales poliméricos con alta afinidad hacia el mercurio y sus especies, sin necesidad de adicionar mercurio durante la polimerización. En ambos estudios se ha empleado el compuesto NOBE, que ejerce dos funciones durante la polimerización: co-monómero y agente entrecruzante. Los monómeros seleccionados para la obtención de estos materiales fueron un derivado de 8-Hidroxiquinolina y un derivado de Tiourea, los cuales contienen átomos de nitrógeno y de azufre, respectivamente, entre sus cadenas, favoreciendo y potenciando la unión del mercurio. Tanto los monómeros mencionados como el NOBE han sido sintetizados previamente ya que no son productos que se puedan obtener comercialmente.

Una vez obtenidos ambos materiales poliméricos, se realizó una completa caracterización, para conocer sus propiedades y su comportamiento. Los estudios realizados con las isothermas de adsorción definieron la capacidad, afinidad y heterogeneidad de los sitios de unión. La selectividad se evaluó mediante ensayos de reactividad cruzada. La validación de ambos métodos se realizó utilizando un material certificado de atún con contenidos de metilmercurio y mercurio total certificados (ERM-CE464). Asimismo, se aplicó a muestras de pescado adquiridas en un supermercado local para la determinación de las especies de mercurio, y a muestras de agua de mar para evaluar la capacidad de pre-concentración.

En el primer trabajo *“A new specific polymeric material for mercury speciation: Application to environmental and food samples”*, se optimizó un procedimiento SPE para evaluar la capacidad del polímero (basado en la 8-Hidroxiquinolina) de retención del mercurio inorgánico y metilmercurio y su posterior elución en dos etapas

consecutivas: la primera, donde se recupera la especie inorgánica y una segunda etapa para obtener el metilmercurio. El reconocimiento de este material hacia las especies de mercurio fue similar en ambos casos y próximo al 100%, obteniéndose recuperaciones cuantitativas en la etapa de elución permitiendo, por tanto, la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio sin necesidad de recurrir a la cromatografía. Paralelamente, ha proporcionado un elevado factor de pre-concentración para mercurio inorgánico en una muestra de agua de mar, sin necesidad de pre-tratamiento previo de la muestra, ya que la retención no se ve interferida por la elevada concentración salina de la misma.

En el segundo trabajo, *“Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species”*, el método empleado en la determinación de las especies de mercurio fue el equipo DMA-80, que consiste en el secado y posterior descomposición térmica de la muestra, seguido de una atomización electrotérmica y detección por absorción atómica. Como en el caso anterior, las especies de mercurio son retenidas por el material polimérico (basado en Tiourea) y la determinación se realizó mediante la optimización de las rampas de temperatura para el análisis de ambas especies empleando el mismo material de referencia certificado citado en el anterior trabajo (ERM-CE464). Se optimizó la mínima cantidad de polímero necesaria para llevar a cabo estos análisis, ya que el polímero se quema en cada análisis. Los resultados obtenidos son semi-cuantitativos, pero suficientes para constatar rápidamente la presencia o ausencia de las especies, siendo de interés fundamentalmente en laboratorios de control alimentario donde por normativa europea EUR 25830 ya están obligados a dar contenidos de metilmercurio. Al igual que en el método de SPE, este procedimiento ofrece la posibilidad de pre-concentrar Hg de muestras como el agua de mar, con alto contenido en sales que provoca corrosión en la amalgama del DMA-80 si se analiza directamente y en consecuencia los resultados carecen de reproducibilidad. Además, las concentraciones son tan bajas (ng/L) que los límites de detección no permiten su cuantificación.

Los resultados obtenidos en ambos casos, refuerzan las alternativas propuestas dejando abierta una puerta hacia su empleo en este tipo de matrices y tal vez, en otras de naturaleza diferente.

**A new specific polymeric material for mercury speciation:
Application to environmental and food samples**

(Analytica Chimica Acta, 2015)

Los resultados de este trabajo fueron presentados como póster y presentación flash en la “XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica”, celebrada en Úbeda del 16-18 Junio del 2013.

Premio SEQA, a una de las mejores comunicaciones presentadas en forma de póster y defendida en la sesión correspondiente como “flash communication”

Patente nº ES-2556156. Material polimérico para la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio



A new specific polymeric material for mercury speciation: Application to environmental and food samples



S. Zarco-Fernández ^a, M.J. Mancheño ^{b, **}, R. Muñoz-Olivas ^{a, *}, C. Cámara ^a

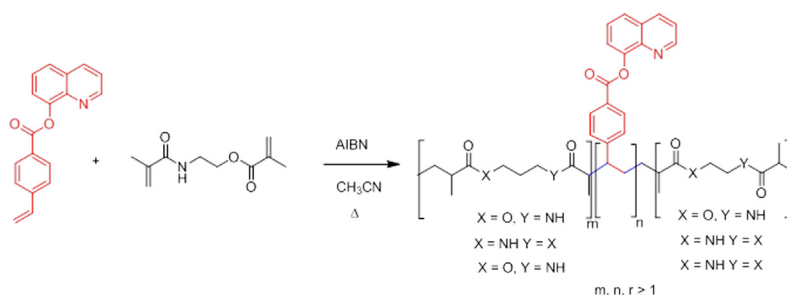
^a Dto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Dto. Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Design, synthesis and characterization of a new polymeric material for Hg retention.
- Sequential speciation of Hg(II) and CH₃Hg.
- Application of the SPE method to fish Hg species monitoring.
- Sensitive determination of Hg in water samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2015

Received in revised form

30 July 2015

Accepted 7 September 2015

Available online 12 September 2015

Keywords:

Mercury speciation

Methylmercury

Fish analysis

Polymer

Preconcentration

ABSTRACT

A new polymeric material (Patent: P201400535) highly specific for mercury is presented. Its great capability to pre-concentrate and selectively elute inorganic mercury and methylmercury are the main figures of merit. The polymer can be reused several times. To our knowledge, this is the only polymer proposed in the literature for direct inorganic mercury and methylmercury speciation without need of chromatography or quantification by difference. The polymer formation is based on the reaction of a vinyl derivative of 8-hydroxyquinoline as monomer, and 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) as co-monomer. Random radical polymerization by the precipitation method was carried out using Azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator. The polymer was characterized by SEM and FTIR. Adsorption binding isotherms were evaluated using Langmuir and Freundlich models, showing high adsorption capacity for both inorganic and organic mercury species. The polymer was employed to sequentially determine inorganic mercury and methylmercury, using a solid phase extraction (SPE) scheme. Cross reactivity of several ions, as well as matrix effects from a high saline matrix like seawater was irrelevant as the retained fractions mostly eluted during the washing step. The procedure was first validated by analyzing a certified reference material (BCR 464) and finally applied to commercial fish samples. The speciation proposed procedure is cheap, fast, and easy to use and minimizes reagents waste.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury is a heavy metal that has been considered one of the most toxic of elements. Its effects in living organisms are devastating, owed to its bioaccumulation in basic nutrients that appear at

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail address: rimunoz@ucm.es (R. Muñoz-Olivas).

the base of the food pyramid and, hence, ingestion later on by humans. The high affinity of mercury by sulfhydryl groups present in proteins and enzymes enhances bioaccumulation in brain, kidney, liver and central nervous system [1–4]. Toxicity depends much on the chemical form present, the organic species being more toxic than inorganic ones.

Mercury is largely released into the environment from gold mining, and burning of fossil fuels. There are several sources of mercury human exposure such as silver–gold amalgam, still used in dental fillings in some countries, or fish consumption. Mercury is generally released as inorganic Hg (II), the major species in environmental samples in water, soils, sediments, etc. Bacteria can transform Hg (II) into methylmercury, CH₃Hg (I), which is ultimately consumed by humans mainly *via* fish and shellfish [2,5]. Legislation for fish establishes different levels for the maximum mercury content: WHO/FAO recommends a limit of 0.5 µg/g in non-predatory fish and 1 µg/g in predatory fish [6] and COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 legislation define two groups: fishery products, mollusks and crustaceans with a limit of 0.5 mg Kg⁻¹ and muscle fish with 1 mg Kg⁻¹Hg maximum allowed [7]. In both cases, the levels referred to are total Hg, creating an important concern to define allowed levels of Hg species. For this reason, it is necessary to develop high sensitive methods for the determination of Hg species.

The common analytical methods for mercury detection are based on spectroscopic techniques such as atomic absorption, emission, and mass spectroscopy. However, there has been a lot of effort devoted to detection and quantification of Hg²⁺ ions, including spectrophotometric analysis or a variety of Hg²⁺ sensing systems [8–16]. For Hg speciation purposes, liquid and gas chromatography coupled to ICP/MS or MS are the mostly applied analytical techniques [17–22].

Solid-phase extraction (SPE) is a good alternative already employed as pre-concentration and cleaning technique for many analytes. The SPE procedures exhibit numerous advantages such as flexibility, favorable adsorption/enrichment factors, high retention capacity, speed and simplicity, possibilities for field sampling, ease of automation and minimal or no consumption of organic solvents [23–27]. So far, the development of effective sorbents for mercury speciation is still a challenge. Several materials such as porous silica, ionic beads or hydrogels [28–32] have been proposed, but in all cases differentiation of Hg species requires the use of chromatographic techniques or off line methods after an adequate sample treatment. Usually, total and inorganic mercury are determined in digested samples and non-digested samples respectively, where the content of organic mercury is calculated by difference [33–38].

Mercury speciation, in this work has been carried out by employing a new selective polymer able to retain both species followed by a sequential elution of inorganic and organic mercury for their quantification. The rational design of the polymeric material is based on the use of a vinyl derivative of 8-hydroxyquinoline, considered one of the most important chelators for metal ions [39–41], specifically for Hg (II) species [42–44] and the comonomer 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE), an efficient crosslinker in radical polymerization reactions [45]. The analytical method presented in this work has provided excellent analytical characteristics compared to other published methods [29,34,46–49].

2. Experimental section

2.1. Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade and used without further purification: Azobisisobutyronitrile (AIBN), 8-hydroxyquinoline

(ACS reagent, 99%), 4-vinyl benzoic acid, oxalyl chloride (reagent grade, 98%), DMF and triethylamine were obtained from Sigma–Aldrich. Acetonitrile was purchased from Scharlau. DMF was dried over calcium hydride and THF over Na and were freshly distilled before use. Purification of the crude reactions was performed by flash column chromatography on Silica gel (Merck, 230–400 mesh), and the identification of products was made by thin layer chromatography (Kieselgel 60F-254). 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) was prepared as previously described [45]. Mercury standard stock solutions of mercury (II) chloride and methylmercury (I) chloride were purchased from Alfa Aesar Karlsruhe, Germany. Stock solution of inorganic species (1000 mg/L) was prepared in deionized Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA) and organic Hg solution (1000 mg/L) was prepared in methanol. Both solutions were stored in amber vessel at –18 °C. Working solutions were daily prepared to reduce the risk of mercury volatilization. For CV-AFS stannous chloride 3% (w/v), used as reducing agent, was made daily, dissolving stannous chloride dehydrate (Merck, Darmstadt, Germany) in concentrated hydrochloric acid and diluted with Milli-Q water. H₂O₂ (35%) from Panreac and HNO₃ (65%) from Scharlab were used for digestion of samples. A tuna fish Certified Reference Material (BCR 464) with Hg (II) and CH₃Hg certified contents was employed to validate the SPE speciation procedure.

2.2. Analytical equipment

An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Merlin 10.023, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total mercury content. Mercury vapor was generated in a flow injection system consisting of a multichannel peristaltic pump, a six-way injection valve and a gas–liquid separator. A Thermo X Series 300 (Thermo Electron Corporation, USA) ICP-MS has been employed for multielemental analysis (Cd, Cu, Pb, As, Se, Hg). CV-AFS and ICP-MS optimized parameters are summarized in Table S1 (see Supporting Information). Ultrasonic bath was employed for mercury species extraction from solid samples (P Selecta, Spain). Extracts were centrifuged in an Eppendorf centrifuge 5804 F34-6-38 (Germany). Microwave acid digestion was performed in a 1000 W MSP microwave oven (CEM MSP 1000, Mathews, NC). Lyophilizer was used for samples drying (Sharp Freeze-110, Teknokroma). A Varian Vac Elut-20 solid phase extraction system with glass cartridge and Teflon frits supplied by J.T. Baker (Deventer, Holland) was used for SPE experiments. The scanning electron micrographs were recorded using a SEM Hitachi S4500.

2.3. Adsorption and desorption experiments

Adsorption of inorganic mercury and methylmercury ions from aqueous solutions was investigated in a conventional SPE device. The scheme employed is illustrated in Fig. 1. About 50 mg of the polymer were placed in a glass solid-phase extraction cartridge provided with Teflon frit. A first conditioning step of the cartridge was performed by passing 5 mL of 2 M HCl in methanol and 5 mL of Milli-Q water. Then, 1 mL aqueous standard was loaded. Next, a washing step was performed with acetonitrile, and finally the sequential mercury elution was done using 3 mL of 2 M HCl in methanol for Hg (II) and then 3 mL of NaClO 20% in 1 M HCl for MeHg. These optimization studies were performed in parallel in separate cartridges for inorganic mercury and methylmercury. Mercury concentration employed for the whole optimization procedure was 50 ng mL⁻¹. Quantification was performed by CVAFS. The instrument response was periodically checked with known metal solution standards. The main parameters affecting retention and elution of inorganic and organic mercury were evaluated. The

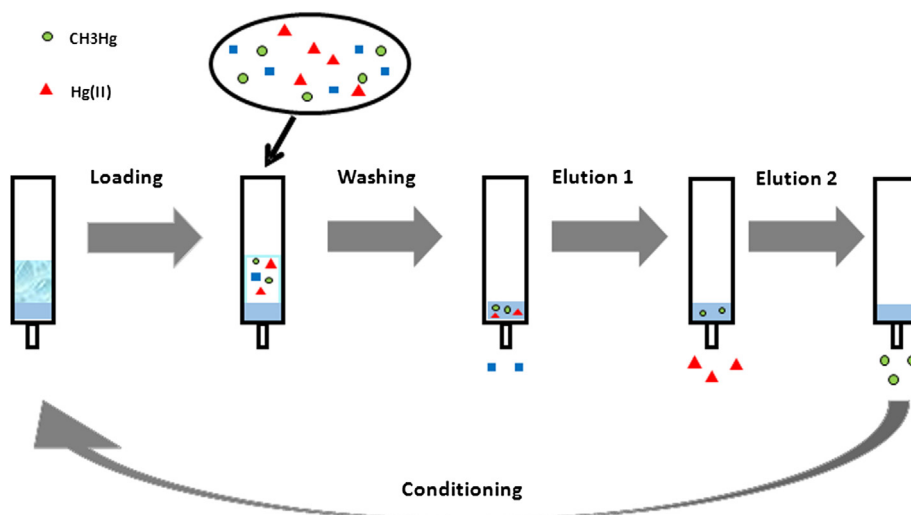


Fig. 1. SPE procedure for inorganic mercury and methylmercury speciation.

experiments were performed in replicates of three. For each set of data, standard statistical methods were used to determine the mean values and standard deviations. Confidence intervals of 95% were calculated for each set of samples in order to determine the margin error.

2.4. Adsorption isotherms

The binding isotherms were calculated using Langmuir and Freundlich equations [50]. The experimental procedure is the same as the described in the previous subparagraph. The loaded amount ranged from 1 to 10^7 ng Hg and was left to reach the equilibrium before proceeding with the SPE steps. The Langmuir equation can be arranged to linear form as:

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{aN_T F} + \frac{1}{N_T} \quad (1)$$

where N_T ($\mu\text{mol/g}$) and a (μM^{-1}) are Langmuir constants related to adsorption capacity and affinity constant, respectively. B ($\mu\text{mol/g}$) and F (μM) are the amount of Hg adsorbed and non-adsorbed at equilibrium conditions, respectively.

The Freundlich equation can be linearized in logarithmic form as:

$$\ln B = m \ln F + \ln a \quad (2)$$

where, a , B and F are the same parameters as before, and m is the heterogeneous coefficient (*being totally homogeneous for $m = 1$*).

On the other hand, Dubinin–Radushkevich (D–R) model determined the nature of adsorption processes as physical or chemical. The linear equation is:

$$\ln B = \ln N_T - \beta \epsilon^2 \quad (3)$$

where β is the activity coefficient related to adsorption mean free energy ($\text{mol}^2 \text{J}^{-2}$) and ϵ is the Polanyi potential ($\epsilon = RT \ln K_c$). The values of mean free energy (E , kJ/mol)

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\beta}} \quad (4)$$

If $E > 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ the adsorption process is chemical, while $E < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ the adsorption process proceeds physically [51,52].

2.5. Sample preparation

Fish samples were firstly lyophilized and kept frozen at -20°C until analysis. Mercury species extraction from 0.1 g dried sample was carried out in an amber vessel with 5 mL of 5 M HCl by applying ultrasound energy in an ultrasonic bath for 30 min [53]. Supernatants were separated from solid by centrifugation, diluted with water in order to reduce acidity before loading into the SPE cartridge filled with 50 mg of polymer. Total mercury content was determined in another sample by applying microwave acid digestion (0.3 g dry sample plus 5 mL nitric acid and 2 mL hydrogen peroxide) [54] in order to compare results with the sum of species obtained by the SPE method. Each sample was performed in replicates of three.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of the polymer

The synthesis of **Polymer 1 (P1)** is described in Fig. 2: 8-hydroxyquinoline derivative (**Monomer 1**) reacts with 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) (**Monomer 2**), selected due to its excellent properties as cross-linker for free radical polymerization [45] in the presence of AIBN as polymerization initiator and acetonitrile as solvent at 65°C under nitrogen atmosphere for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the polymer was washed with water and methanol. The polymer was prepared by precipitation polymerization; thus submicron scale beads were obtained. The synthesis procedure for Monomer 1 is given in the Supplementary Material (Figure S1).

Characterization of **P1** was performed by several techniques: FTIR analysis showed a broad signal around 3421 cm^{-1} that can be assigned to NH of the amide group by comparison with IR spectrum of Monomer 2, as well as stretching frequencies at 1725 and 1652 cm^{-1} that can be assigned to the esters and amide groups present in the polymer backbone consisting mainly of acrylamide units (Fig. 3 (I)). The presence of mercury ions in **P1** does not modify the FTIR spectra because the interaction with mercury ions has been established by coordination of these species by quinoline comonomer as stated before. Microscopic analysis was performed by Scanning Electronic Microscopy. Fig. 3 (II) showed the morphology of the synthesized polymer in two different resolution modes. It seems that **P1** produces uniform aggregates. The

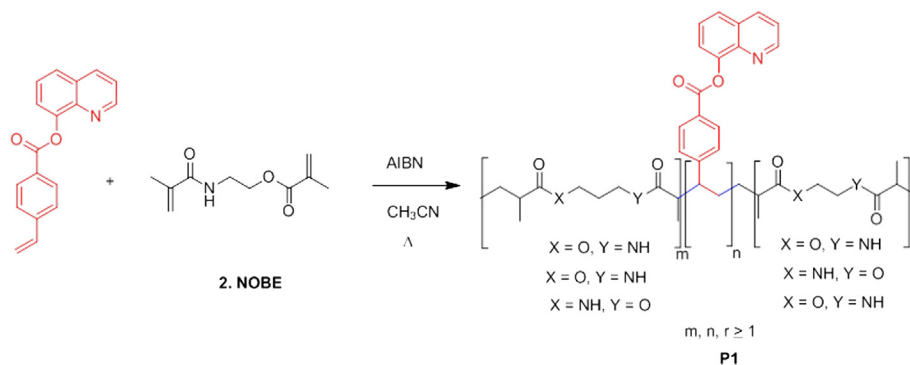


Fig. 2. Synthesis of polymer P1.

adsorption data for Hg (II) and CH₃Hg were modeled with the two isotherms described in the experimental part (see Figure S2 (I); S2(II), Supporting information). The affinity constants were summarized in Table 1. These results showed the high affinity of this material to mercury for both inorganic and organic forms. The values of the correlation coefficients obtained from Langmuir expression ($R^2 = 0.9971$, $R^2 = 0.9949$) fit better than Freundlich model ($R^2 = 0.8768$, $R^2 = 0.8279$). Similar adsorption parameters already published [34,46,47] are summarized in Table 2 for comparative purposes. All these examples reported only adsorption for Hg (II). Thermodynamic isotherms were also calculated according to Qu et al., 2012 and Cao et al., 2014 [51,52]. Results led us to state that the adsorption responds mainly to a chemical process

and negative ΔG values indicated spontaneous adsorption process (see Table S2 in Supporting Information).

3.2. Analytical SPE procedure optimization

Hg loading is performed in aqueous media, so pH effect was studied in order to cover the different samples of interest: from acidic (fish extracts) to pH = 7–8 (seawater). Although the optimum sorption loading occurs at neutral pH, the encountered differences were not significant among the pH range concerned. In spite of this finding, fish extracts highly acidic are diluted before loading. Once the retention capability of the polymer was demonstrated, several solvents and the minimum volume necessary to sequentially and quantitatively elute both mercury compounds were tested. Solvents employed were from organic acids like acetic acid to mineral acids as HCl, HNO₃, or strong oxidative salts like NaClO. Combination of acids and alcohols showed more powerful dragging capacity than their independent use [48,49,55]. Optimization was performed in parallel experiments in separate cartridges for Hg (II) and CH₃Hg (I). Most promising results were obtained by employing 3 mL 2 M HCl in MeOH (90 ± 6% recovery of Hg (II)), and 3 mL 20% NaClO in 1 M HCl (85 ± 5% recovery for CH₃Hg). When HCl in MeOH is used as desorption agents, the spheres of chelated mercury are disrupted and subsequently mercury is released into the desorption medium. For CH₃Hg desorption first is needed the conversion to Hg (II) by employing a strong oxidizing agent like NaClO. Non-specific interactions in all cases were removed using 1 mL of acetonitrile in the washing step.

The reusability of the polymer was evaluated by repeating adsorption–desorption cycles and by calculating the adsorbed and eluted amounts. Each fraction of polymer can be employed at least 20 cycles with reproducibility around 5% in all cases.

3.3. Cross-reactivity experiments

Selectivity of P1 towards mercury species has been checked by measuring the competitive adsorption of Hg (II) and CH₃Hg (I)

Table 1
Adsorption binding isotherm parameters for Hg (II) and CH₃Hg (I). *Freundlich and Langmuir models.*

Isotherm model	Parameters	Hg (II)	CH ₃ Hg
Langmuir	N_T ($\mu\text{mol/g}$)	23	8
	a (mM^{-1})	14	22
	R^2	0.9971	0.9948
Freundlich	a	9.53	0.92
	m	0.886	0.821
	R^2	0.8768	0.8279

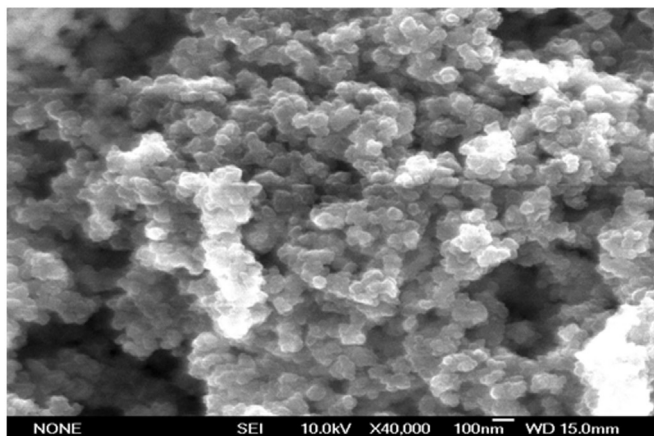
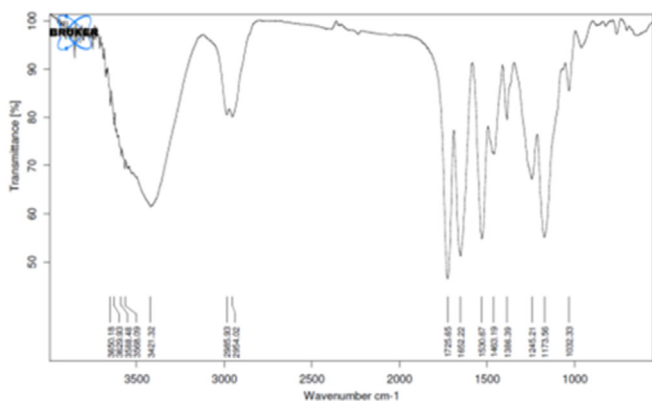


Fig. 3. Characterization of P1. I) FTIR in KBr; II) SEM micrographs.

Table 2

Comparative binding isotherm values for different polymers reported in the literature. All these values are referred to Hg (II).

Complex	Monomer	Crosslinker	Porogen	Affinity constants	Ref.
4-2-thiazoylazo resorcinol (TAR)	Methacrylic acid (MAA)	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	Cyclohexanol	Nt = 57.6 $\mu\text{mol/g}$ a = 45 mM^{-1}	[40]
N-methacryloyl (L) cystine (MAC)	2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA)	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	Toluene	Nt = 2.3 $\mu\text{mol/g}$ a = 43.6 mM^{-1}	[41]
1-pyrrolidine dithiocarboxylic acid	Methacrylic acid (MAA)	Trimethylolpropene trimethylacrylate (TMPTMA)	Acetonitrile	Nt = 62 $\mu\text{mol/g}$ a = 20 mM^{-1}	[29]

versus Cu (II), Cd (II), Pb (II), As (V) and Se (VI) ions at the same concentration level (50 ng mL^{-1}) [56]. These ions were loaded together with inorganic mercury, following the above procedure. The extracts from the different steps were measured by ICP/MS. Results obtained have been summarized in Fig. 4. – i) arsenic and selenium retention was irreproducible and rather low; in addition, most of the retained amounts were clean out during the washing step due to non-specific interactions. The low retention can be due to their anionic character; ii) retention of copper, lead and cadmium were higher than 50% as expected due to their similar chemical properties to Hg (II), and consequently moderate affinity for the amide groups present in the polymer backbone. Nevertheless, a significant amount of Hg in both cases is dragged out during the washing step, indicating much less affinity - for the active sites of the polymer - of the other ions than for mercury. Calculation of distribution and selectivity coefficients gave numerical data that confirm that mercury retention was unaffected by the presence of the other ions. Distribution coefficient K_d , and selectivity coefficient, k have been calculated according to Equations (5) and (6).

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \frac{V}{m} \quad (5)$$

$$k = \frac{K_d(\text{Hg})}{K_d(M)} \quad (6)$$

where C_i and C_f are initial and final concentrations of metals; V is the volume of solution used and m is mass of sorbent employed [47]. Values of such coefficients, summarized in Table 3, are greater than 1 in all cases, confirming a high selectivity of P1 for mercury ions in the presence of concomitant elements. According to these experiments, competitive effects of other major ions like Na, K, Ca, Mg that could be present in biological samples were also evaluated by loading seawater. None decrease the retention capacity of inorganic Hg and the only precaution needed was to append an additional step of removing salts after sample loading by passing 5 mL of ultrapure pure water and before Hg elution.

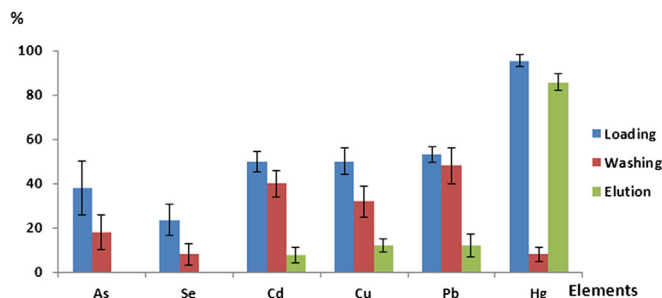


Fig. 4. Cross-reactivity experiments to check polymer selectivity towards inorganic Hg species. 50 mg of P1; $[\text{Hg}] = [\text{Cd}] = [\text{Cu}] = [\text{Pb}] = [\text{Se}] = [\text{As}] = 50 \text{ ng mL}^{-1}$.

Table 3 k_d and k values of several ions respect to Hg (II).

Metal ion	K_d (mL g^{-1})	k
Hg (II)	380	–
As (V)	152	2.50
Se (IV)	96	3.95
Cd (II)	200	1.90
Cu (II)	208	1.83
Pb (II)	212	1.79

3.4. Inorganic and organic mercury speciation

The polymeric material described enabled the separation of both mercury species (Hg (II) and CH_3Hg) without the need of employing chromatography. A two-steps sequential elution applied in the same cartridge led us to separately recover both mercury species. First, inorganic mercury was completely recovered after elution with 3 mL of 2 M HCl in methanol and second, methylmercury was eluted with 5 mL of NaClO 20% in 1 M HCl. We can underline that the retention percentage of Hg (II) is slightly higher than CH_3Hg (I) which could be explained by the specific chelation properties of quinoline derivative monomer for Hg (II) [42]. Elution of the loaded amount, a critical step for speciation purposes, ranges 90–95% for both species. The method was validated by analyzing a tuna fish certified reference material (BCR-464). Concentrations found were listed in Table 4. The good agreement between the methylmercury concentrations found and the certified values was tested by the t test at 95% confidence level proving that there were no significant differences. The relative standard deviation of six replicate determinations was comprised in the 5–6% range.

3.5. Application to environmental samples

3.5.1. Speciation in fish samples

The method was applied to swordfish (*Aphanopuscarbo*) and tuna fish (*Thunnus*) purchased at local supermarkets. The sample method treatment was detailed in the experimental section. Analytical figures gave us a quantification limit of 0.015 mg/kg. The wet acid extraction method applied is based on the use of a conventional ultrasonic bath and was very convenient in comparison with recent methods reported in the literature that employed focalized ultrasonic energy (ultrasonic probe during 5 min) but only one sample can be run at once [57]. We foresee our method to be employed in governmental and stated-own laboratories that monitor and control mercury and methylmercury contents in an elevated number of samples. Hg content in fish samples were listed in Table 4. Concentration values were displayed as dry weight but also as wet weight because the legislation is expressed only in fresh weight [6,7]. Swordfish total content exceeds the maximum allowed legislation limits ($1 \mu\text{g/g}$). FDA described that most people are exposed to around 50 ng/kg/day of mercury through the food chain. This value is equivalent to $3,4 \mu\text{g/day}$ of mercury for a weight average adult [57–59] which is within the content found in the commercial samples analyzed considered in this context.

Table 4
Non-chromatography speciation in Fish and CRM samples. [Hg] = µg/g.

Sample	Moisture (%)	CH ₃ Hg (dry weight)	Hg (II) (dry weight)	Total mercury (dry weight)	CH ₃ Hg (fresh weight)	Total mercury (fresh weight) ^a
Swordfish	71	4.0 ± 0.5	0.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.1b
Tuna	60	2.6 ± 0.5	0.9 ± 0.1	3.5 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
BCR 464	–	5.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	5.4 ± 0.3	–	–

Legislation value: 1.0 (µg/g) total Hg fresh weight [7].

Certified values: CH₃Hg: 5.50 ± 0.17 µg/g; Total Hg: 5.24 ± 0.10 µg/g.

Results are expressed as mean value ± standard deviation (n = 6).

^a Total Hg amount after microwave acid digestion.

Comparison of this method with the standard operation procedure (SOP) proposed by EU [60] presents several advantages in terms of sample treatment: first, the method developed is simpler, faster and less waste producing due to the use of the described SPE scheme instead a double liquid–liquid extraction (employing toluene, HBr, K₂Cr₂O₇, L-cysteine). Second, and more importantly, is the direct quantification of CH₃Hg (I) separately from Hg (II) instead of the SOP method that quantifies Hg (II) by difference.

3.5.2. Mercury pre-concentration in seawater

Mercury content in seawater is in the ngL⁻¹ level [59]. The detection limit provided by the SPE method in this matrix was 500 ng Hg L⁻¹, not sensitive enough. A pre-concentration step was needed. For this purpose, seawater spiked with 10 ng Hg.L⁻¹ was loaded into the polymer following the same steps optimized and described in the experimental part. An additional step was appended after sample loading by passing 5 mL of ultrapure water to remove salts. No additional matrix effect was observed. Elution of species was applied in the same manner as previously explained without lessening the efficiency of the method. Under these conditions, the pre-concentration factor achieved was 40 without observing any effect due to breakthrough volumes that seemed sufficient to reach Hg concentration levels in seawater. Recovery of 102 ± 3% of the spiked amount was achieved for six replicate measurements. This second approach makes the synthesized polymer a versatile material for high sensitive environmental Hg analysis in saline matrices.

Finally, Table S3 (Supporting Information), shows a comparison of the analytical characteristics of the polymer presented in this work to other readily available adsorbents. It clearly demonstrates the excellent characteristics of the polymer presented in this study - in terms of detection limits, adsorption capacity, etc.

4. Conclusions

A novel polymeric material has been synthesized for mercury species determination. It has shown great selective affinity towards mercury species. The main achievement of the polymer is based on mercury species sequential elution, it allows a non-chromatographic speciation of mercury in complex fish samples. The pre-concentration factor achieved in seawater leads to a new alternative for highly sensitive mercury analysis. This material represents a good alternative to other techniques because the SPE procedure is simple, fast, low cost and environmentally friendly due to the small solvent amounts employed. Furthermore, the method requires low sample handling minimizing the sources of error. The proposed method has been conveniently validated for mercury speciation in fish samples in routine laboratories.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness for the financial support (CTQ 2011–28328-C02-01)

the European Project ORQUE SUDOE SOE3/P2/F591 and the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) and European funding from FEDER program (Project S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.016>.

References

- [1] R.A. Bernhoft, Mercury toxicity and treatment: a review of the literature, *J. Environ. Public Health* 2012 (2012) 1–10.
- [2] U.N.E.P. (UNEP), *Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport*, Geneva, Switzerland, 2013.
- [3] F. Zahir, S.J. Rizwi, S.K. Haq, R.H. Khan, Low dose mercury toxicity and human health, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (2005) 351–360.
- [4] M. Farina, J.B.T. Rocha, M. Aschner, Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies, *Life Sci.* 89 (2011) 555–563.
- [5] N. Silica, T. Sangvanich, J. Morry, C. Fox, W. Ngamcherdrakul, S. Goodyear, et al., Novel oral detoxification of mercury, cadmium, and lead with thiol-modified nanoporous silica, *Appl. Mater. Interfaces* (2014) 5483–5493.
- [6] FAO/WHO, *Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption*, Rome, Italy EC: RBFC/2010/3, 2010.
- [7] Commission Regulation (EC) No 1881/2006, 2005.
- [8] L. Deng, X. Ouyang, J. Jin, C. Ma, Exploiting the higher specificity of silver amalgamation: selective detection of mercury (II) by forming Ag/Hg amalgam, *Anal. Chem.* 85 (2013) 8594–8600.
- [9] G. Sener, L. Uzun, A. Denizli, Lysine-promoted colorimetric response of gold nanoparticles: a simple assay for ultrasensitive mercury(II) detection, *Anal. Chem.* 86 (2014) 514–520.
- [10] L. Zhang, T. Li, B. Li, J. Li, E. Wang, Carbon nanotube-DNA hybrid fluorescent sensor for sensitive and selective detection of mercury(II) ion, *Chem. Commun.* 46 (2010) 1476–1478.
- [11] Z. Zhu, Y. Su, J. Li, D. Li, J. Zhang, S. Song, et al., Highly sensitive electrochemical sensor for mercury(II) ions by using a mercury-specific oligonucleotide probe and gold nanoparticle-based amplification, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7660–7666.
- [12] G.-H. Chen, W.-Y. Chen, Y.-C. Yen, C.-W. Wang, H.-T. Chang, C.-F. Chen, Detection of mercury(II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices, *Anal. Chem.* 86 (2014) 6843–6849.
- [13] T.H. Kim, J. Lee, S. Hong, Highly selective environmental nanosensors based on anomalous response of carbon nanotube conductance to mercury ions, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 19393–19396.
- [14] H.R. Lotfi Zadeh Zhad, R.Y. Lai, A Hg(II)-mediated "signal-on" electrochemical glutathione sensor, *Chem. Commun.* 50 (2014) 8385–8387.
- [15] B.K. Jena, C.R. Raj, Gold nanoelectrode ensembles for the simultaneous electrochemical detection of ultratrace arsenic, mercury, and copper, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4836–4844.
- [16] O. Guney, F.C. Cebeci, Molecularly imprinted fluorescent polymers as chemosensors for the detection of mercury ions in aqueous media, *J. Appl. Polym. Sci.* 117 (2010) 2373–2379.
- [17] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS, *Talanta* 82 (2010) 594–599.
- [18] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, N. Rodríguez Fariñas, M.J. Patiño Roper, Mercury speciation analysis in terrestrial animal tissues, *Talanta* 99 (2012) 859–864.
- [19] L. Wu, Z. Long, L. Liu, Q. Zhou, Y.-I. Lee, C. Zheng, Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry, *Talanta* 94 (2012) 146–151.
- [20] A.Q. Shah, T.G. Kazi, J.A. Baig, H.I. Afridi, M.B. Arain, Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* 134 (2012) 2345–2349.

- [21] Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng, X. Hou, Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry, *Microchem. J.* 103 (2012) 1–14.
- [22] M.P. Rodríguez-Reino, R. Rodríguez-Fernández, E. Peña-Vázquez, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Mercury speciation in seawater by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry following solid phase extraction pre-concentration by using an ionic imprinted polymer based on methyl-mercury–phenobarbital interaction, *J. Chromatogr. A* 1391 (2015) 9–17.
- [23] E. Yilmaz, M. Soyak, Solid phase extraction of Cd, Pb, Ni, Cu, and Zn in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes, *Environ. Monit. Assess.* 186 (2014) 5461–5468.
- [24] M.C. Barciela-Alonso, V. Plata-García, a. Rouco-López, a. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, Ionic imprinted polymer based solid phase extraction for cadmium and lead pre-concentration/determination in seafood, *Microchem. J.* 114 (2014) 106–110.
- [25] S. Büyüktiryaki, R. Say, A. Denizli, A. Ersöz, Mimicking receptor for methyl-mercury pre-concentration based on ion-imprinting, *Talanta* 71 (2007) 699–705.
- [26] E. Najafi, F. Aboufazel, H.R.L.Z. Zhad, O. Sadeghi, V. Amani, A novel magnetic ion imprinted nano-polymer for selective separation and determination of low levels of mercury(II) ions in fish samples, *Food Chem.* 141 (2013) 4040–4045.
- [27] S. Xu, L. Chen, J. Li, Y. Guan, H. Lu, Novel Hg²⁺-imprinted polymers based on thymine–Hg²⁺–thymine interaction for highly selective pre-concentration of Hg²⁺ in water samples, *J. Hazard. Mater.* 237–238 (2012) 347–354.
- [28] M. Kim, H.-J. Um, S. Bang, S.-H. Lee, S.-J. Oh, J.-H. Han, et al., Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9335–9340.
- [29] X. Liu, C. Qi, T. Bing, X. Cheng, D. Shangguan, Specific mercury (II) adsorption by thymine-based sorbent, *Talanta* 78 (2009) 253–258.
- [30] A. Kara, L. Uzun, N. Beşirli, A. Denizli, Poly(ethylene glycol dimethacrylate-*n*-vinyl imidazole) beads for heavy metal removal, *J. Hazard. Mater.* 106 (2004) 93–99.
- [31] N. Li, R. Bai, C. Liu, Enhanced and selective adsorption of mercury ions on chitosan beads grafted with polyacrylamide via surface-initiated atom transfer radical polymerization, *Langmuir* 21 (2005) 11780–11787.
- [32] N. Dave, M.Y. Chan, P.-J. Huang, B.D. Smith, J. Liu, Regenerable DNA-functionalized hydrogels for ultrasensitive, instrument-free mercury(II) detection and removal in water, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12668–12673.
- [33] B. Díaz de Greñu, J. García-Calvo, J. Cuevas, G. García-Herbosa, B. García, N. Busto, et al., Chemical speciation of MeHg⁺ and Hg²⁺ in aqueous solution and HEK cells nuclei by means of DNA interacting fluorogenic probes, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3757–3764.
- [34] T. Yordanova, I. Dakova, K. Balashev, I. Karadjova, Polymeric ion-imprinted nanoparticles for mercury speciation in surface waters, *Microchem. J.* 113 (2014) 42–47.
- [35] E.K. Mladenova, I.G. Dakova, D.L. Tsalev, I.B. Karadjova, Mercury determination and speciation analysis in surface waters, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 1175–1182.
- [36] I. Dakova, T. Yordanova, I. Karadjova, Non-chromatographic mercury speciation and determination in wine by new core – shell ion-imprinted sorbents, *J. Hazard. Mater.* 231–232 (2012) 49–56.
- [37] D. Nalluri, Z. Baumann, D.L. Abercrombie, D.D. Chapman, C.R. Hammerschmidt, N.S. Fisher, Methylmercury in dried shark fins and shark fin soup from American restaurants, *Sci. Total Environ.* 496 (2014) 644–648.
- [38] I. Dakova, I. Karadjova, V. Georgieva, G. Georgiev, Ion-imprinted poly-methacrylic microbeads as new sorbent for pre-concentration and speciation of mercury, *Talanta* 78 (2009) 523–529.
- [39] H. Zhang, L.-F. Han, K. a Zachariasse, Y.-B. Jiang, 8-Hydroxyquinoline benzoates as highly sensitive fluorescent chemosensors for transition metal ions, *Org. Lett.* 7 (2005) 4217–4220.
- [40] P. Jiang, Z. Guo, Fluorescent detection of zinc in biological systems: recent development on the design of chemosensors and biosensors, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 205–229.
- [41] J. Otero-Romaní, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, A. Martín-Esteban, Ionic imprinted polymer for nickel recognition by using the bi-functionalized 5-vinyl-8-hydroxyquinoline as a monomer: application as a new solid phase extraction support, *Microchem. J.* 93 (2009) 225–231.
- [42] F. Loe-Mie, G. Marchand, J. Berthier, N. Sarrut, M. Pucheault, M. Blanchard-Desce, et al., Towards an efficient microsystem for the real-time detection and quantification of mercury in water based on a specifically designed fluoro-genic binary task-specific ionic liquid, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (2010) 424–427.
- [43] N. Ratner, D. Mandler, Electrochemical detection of low concentrations of mercury in water using gold nanoparticles, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5148–5155.
- [44] A. Gupta, A. Chaudhary, P. Mehta, C. Dwivedi, S. Khan, N.C. Verma, et al., Nitrogen doped thiol functionalized carbon dots for ultrasensitive Hg (II) detection, *Chem. Commun.* 51 (2015) 10750–10753.
- [45] M. Sibrian-Vazquez, D.A. Spivak, Enhanced enantioselectivity of molecularly imprinted polymers formulated with novel cross-linking monomers, *Macromolecules* 36 (2003) 5105–5113.
- [46] D.K. Singh, S. Mishra, Synthesis and characterization of Hg(II)-ion-imprinted polymer: kinetic and isotherm studies, *Desalination* 257 (2010) 177–183.
- [47] M. Andaç, S. Mirel, S. Senel, R. Say, A. Ersöz, A. Denizli, Ion-imprinted beads for molecular recognition based mercury removal from human serum, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 159–166.
- [48] Z. Wang, G. Wu, C. He, Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions, *Microchim. Acta* 165 (2008) 151–157.
- [49] Y. Liu, Y. Zai, X. Chang, Y. Guo, S. Meng, F. Feng, Highly selective determination of methylmercury with methylmercury-imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 159–165.
- [50] M. Gallego-Gallegos, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, Different formats of imprinted polymers for determining organotin compounds in environmental samples, *J. Environ. Manag.* 90 (Suppl. 1) (2009) S69–S76.
- [51] R. Qu, C. Sun, F. Ma, Z. Cui, Y. Zhang, X. Sun, et al., Adsorption kinetics and equilibrium of copper from ethanol fuel on silica-gel functionalized with amino-terminated dendrimer-like polyamidoamine polymers, *Fuel* 92 (2012) 204–210.
- [52] F. Cao, P. Yin, X. Liu, C. Liu, R. Qu, Mercury adsorption from fuel ethanol onto phosphonated silica gel prepared by heterogenous method, *Renew. Energy* 71 (2014) 61–68.
- [53] A.V. Zmozinski, S. Carneado, C. Ibáñez-Palomino, À. Sahuquillo, J.F. López-Sánchez, M.M. da Silva, Method development for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in seafood, *Food Control.* 46 (2014) 351–359.
- [54] A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoréu, C. Cámara, Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal, *Biol. Trace Elem. Res.* 103 (2005) 17–35.
- [55] J.L. Capelo, G.M. Rivas, L.G. Oliveira, C. Vilhena, A.C. Santos, T. Valada, et al., Mercury determination by FI-CV-AAS after the degradation of organomercurials with the aid of an ultrasonic field: the important role of the hypochlorite ion, *Talanta* 68 (2006) 813–818.
- [56] F. Borrull, N. Masque, Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction, *Trac. Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 477–486.
- [57] L. Schmidt, C.A. Bizzi, F.A. Duarte, E.I. Muller, E. Krupp, J. Feldmann, et al., Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish, *Food Control.* 47 (2015) 413–419.
- [58] W.C. Li, H.F. Tse, Health risk and significance of mercury in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (2015) 192–201.
- [59] H. Javed, M. Javed, Mercury concentrations in environment: a cause of concern for human health, *Int. J. Biol. Biol. Sci.* 2 (2013) 114–121.
- [60] J. Calderon, S. Gonçalves, F. Cordeiro, B. de la Calle, Determination of methylmercury in seafood by direct mercury analysis: standard operating procedure, IMEP-115, EUR 25830 EN 2013

Supporting Information

A new specific polymeric material for mercury speciation: Application to environmental and food samples.

S. Zarco-Fernández¹, M.J. Mancheño^{2*}, R. Muñoz-Olivas^{1*}, C. Cámara¹

¹Dto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

²Dto. Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Corresponding author: rimunoz@ucm.es

General Procedures:

A flame dried glassware and standard Schlenk techniques were used for moisture-sensitive reactions. DMF was dried over calcium hydride and THF over Na and were freshly distilled before use. Purification of the crude reactions was performed by flash column chromatography on Silica gel (Merck, 230-400 mesh), and the identification of products was made by thin layer chromatography (kieselgel 60F-254). UV light ($\lambda = 254$ nm) and 5% phosphomolybdic acid solution in 95% EtOH were used to develop the plates. NMR spectra were recorded at 22°C in CDCl₃ on Bruker Advance DPX 300 (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts are given in ppm relative to CDCl₃ (7.26 ppm for ¹H; 77.0 ppm for ¹³C). The splitting patterns are designated as follows: s = singlet, d = doublet, m = multiplet, bs = broad signal. IR spectra were taken on a Brüker Tensor 27 (MIR 8000-400 cm⁻¹) spectrometer. MS experiments (EI) were carried out on a MAT95 XP spectrometer. Elemental analyses were conducted on a LECO CHNS-932.

Synthesis of Monomer 1, Quinolin-8-yl 4-vinylbenzoate: Anhydrous DMF (12 drops) was added to vinyl benzoic acid (830 mg, 5.6 mmol) in anhydrous THF (15 mL). The mixture was cooled to 0°C and oxalyl chloride (0.7 mL, 8.02 mmol) was added dropwise. After 15 min at 0°C, the mixture was stirred for 3 h at 20°C. Solvent and excess oxalyl chloride was eliminated under vacuum. The obtained residue was dissolved in dry THF (15 mL), then 8-hydroxyquinoline (0.82 g, 5.6 mmol) and triethylamine (1 mL, 7.2 mmol) were added. The mixture was stirred for 4 h at 20°C. Dichloromethane (20 mL) was added to the mixture which was then washed with water (3 x 15 mL), dried under MgSO₄ and the solvent removed under vacuum. The remaining yellow solid was purified by flash chromatography on silica gel. (Hexanes: Diethyl ether mixtures). The Monomer **1** was obtained as a white powder (0.78 g, 50%). M.p: 148-150 °C.

¹H NMR(CDCl₃): 5.43 (d, $J = 11$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 17.7$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 17.7$, $J = 11$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.3$, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.57 (m, 4H), 7.76 (m, 1H), 8.19 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.89 (dd, $J = 4.3$, $J = 1.7$ Hz 1H). ¹³CNMR (CDCl₃): 165.2 (C=O), 150.6 (CH), 147.8 (Cq), 142.5 (CH), 141.4 (Cq), 136.1 (Cq), 135.9 (CH), 130.9 (CH), 129.6 (Cq), 128.6 (Cq), 126.3 (CH), 126.2 (CH), 125.9 (CH), 121.7 (CH), 121.6 (CH), 116.7 (CH₂). IR (KBr):

1736, 1604, 1499, 1266, 1234, 1173, 1096 cm⁻¹. MS (EI) m/z: 275.09 (M⁺, 66%), 132.05 (52%), 131.05 (100%), 103.05 (73%), 77.04 (68%). Elemental Analysis: C, 78.53; H, 4.76; N, 5.09 C₈H₁₃NO₂ requires C, 78.60; H, 4.73; N, 5.13.

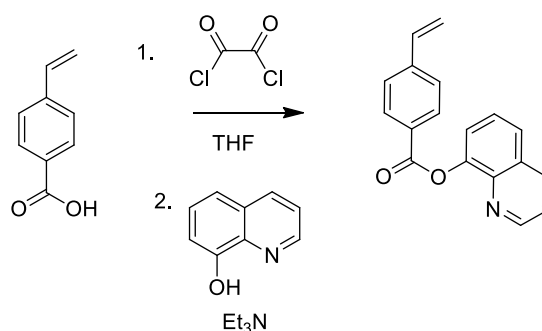
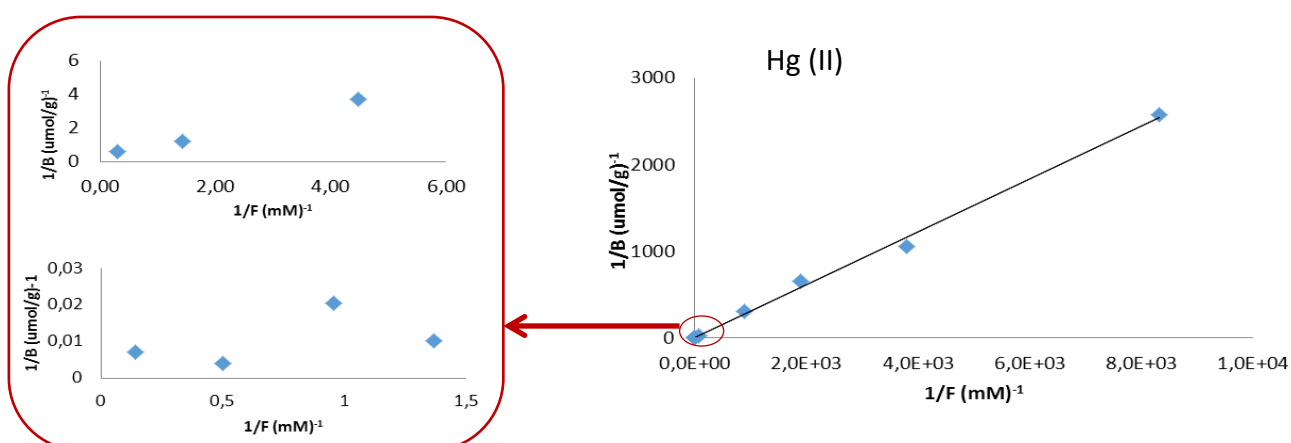


Figure S1: Synthesis of Monomer 1

Synthesis of P1: Polymer synthesis was carried out by the precipitation technique [1]. In an amber vessel **Monomer 1** (35 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 4 mL of acetonitrile. The mixture was sonicated 30 minutes at room temperature. Then **Monomer 2** (NOBE) (600 mg, 3 mmol) and AIBN (100 mg,) as initiator were added under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was kept in a silicone bath at 65°C and was stirred during 24 h until completion of the polymerization process [2]. The solvent was evaporated and the solid was washed with water and methanol by centrifugation (8000 rpm, 10 min), the supernatant was removed and the polymer was conditioned using 2 M HCl in methanol.

Characterization of polymer P1

Binding isotherm experiment: Langmuir and Freundlich models have been plotted with the experimental data



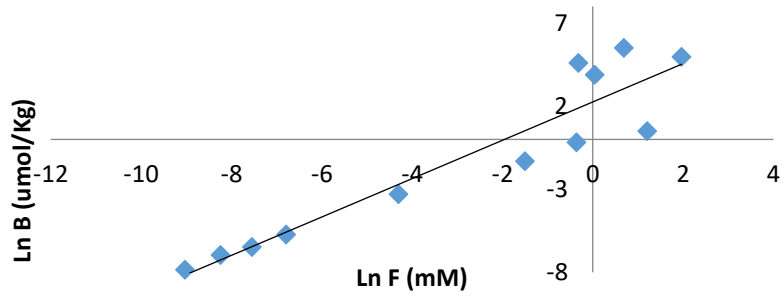


Figure S2-I: Langmuir isotherm

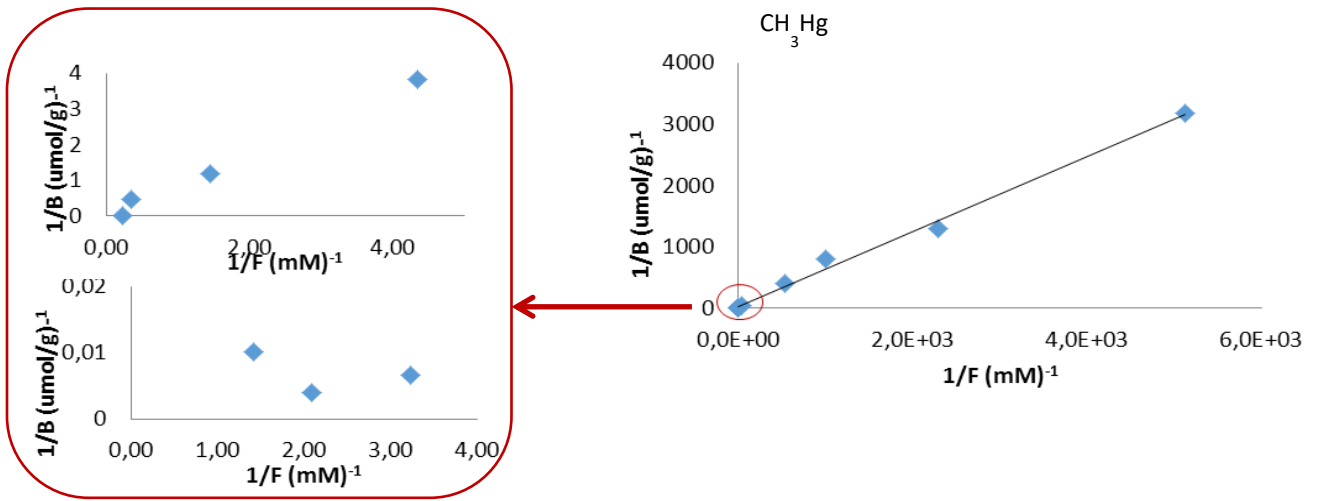
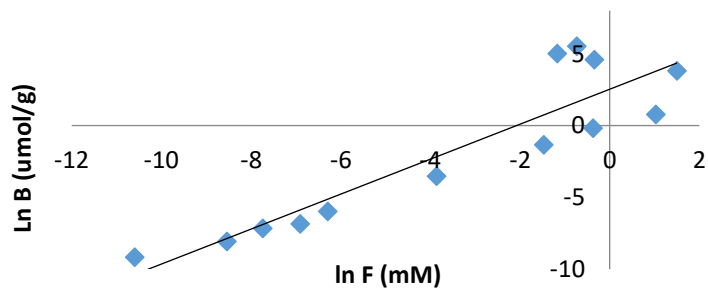


Figure S2-II: Freundlich isotherm



CV-AFS	
Carrier and reductor agent flow rates)	1 mL min ⁻¹
Carrier gas flow (Ar)	300 mL min ⁻¹
Membrane gas flow (Ar)	1000 mL min ⁻¹
Detector gas flow (Ar)	400 mL min ⁻¹
Loop sample volume	200 μ L
SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)	
Conditioning	5 mL 2M HCl : 5 mL H ₂ O
Loading	1 mL analyte in H ₂ O
Washing	1 mL Acetonitrile
Elution 1 (Hg ²⁺)	3 mL 2M HCl in methanol
Elution 2 (CH ₃ Hg)	5 mL 20% NaClO in 1M methanol

Table S1: Experimental parameters for mercury determination using CV-AFS; Solid Phase Extraction conditions for Hg (II) and CH₃Hg speciation

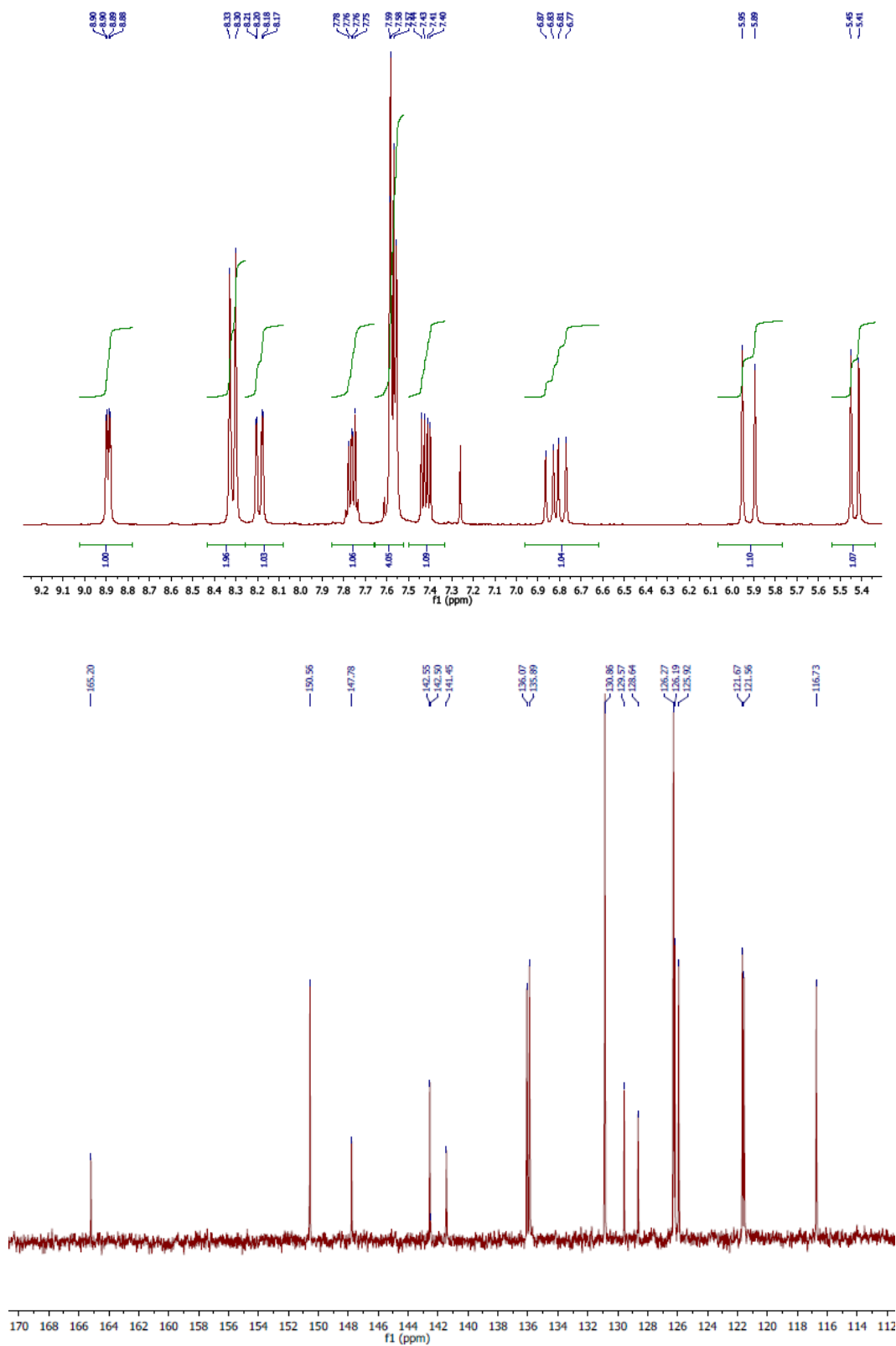
	$\beta \times 10^8$ (mol ² /J ²)	E (Kj/mol)	$\epsilon^2 \times 10^8$ (J ² /mol ²)	ΔG (Kj/mol)
Hg (II)	0.27	13.6	1.42	-11.9
CH₃Hg	0.45	10.5	2.39	-15.45

Table S2: Dubinin-Radushkevich constants and thermodynamic parameters

Reference	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	This work
C max (gHg/g poly)	0.2	0.25	0,08	0.028	0.04	0.92	0.04	ND*	1
Application	Tap water	Human hair and sediments	Tap, river and sea water	Tap water	Water	Synthetic seawater	Water	River and sea water	Fish and sea water
Detection limit $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g kg}^{-1}$	ND*	0.041	0.05	ND*	0.015	20	0.06	0.059	0.01
Preconcentration factor	ND*	ND*	12.5	ND*	25	20	75	50	167
N^a uses	15	20	20	ND*	100	10	6	ND*	20
Description	ND*	1M Thiourea in 4M HCl 2 h	0.1 M HCl + thiourea	acidic solution of thiourea,	2ml 0.1M thiourea in 0.1 M HCl. 30 min	5.0 ml 2.0M HCl in 1.0M thiourea 1 h.	DDW, 1 M HNO ₃ , DDW in sequence	1ml 6 HNO ₃	3 ml HCl 2M in MeOH, 5ml NaOCl
Adsorption	50 mg 30 mL 20 min Sorbent (mg) Volume (mL)	20 mg 50 mL 60 min Sorbent (mg) Volume (mL)	50mg 5 mL 60 min Sorbent (mg) Volume (mL)	25 mg 25 mL 50 min Sorbent (mg) Volume (mL)	50mg 10 mL 30 min Sorbent (mg) Volume (mL)	25 mg 50 mL 50 min Sorbent (mg) Volume (mL)	100mg 10 mL 20 min Sorbent (mg) Volume (mL)	50mg 50 mL 10 min Sorbent (mg) Volume (mL)	50 mg 1mL 5 min Sorbent (mg) Volume (mL)
Analyte	Hg ²⁺	CH ₃ Hg	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Hg ²⁺	CH ₃ Hg	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg

Table S3: Comparison of analytical characteristics among similar adsorbents published

Attached



Spectra of **Monomer 1**: ¹H NMR and ¹³C NMR of Quinolin-8-yl 4-vinylbenzoate

References

- [1] N. Pérez-Moral, A. Mayes, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Anal. Chim. Acta.* 504 (2004) 15–21.
- [2] B.K. Puri, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, A new polymeric adsorbent for screening and pre-concentration of organotin compounds in sediments and seawater samples, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 59 (2004) 209–214..
- [3] X. Liu, C. Qi, T. Bing, X. Cheng, D. Shangguan, Specific mercury(II) adsorption by thymine-based sorbent., *Talanta.* 78 (2009) 253–258. d.
- [4] Y. Liu, Y. Zai, X. Chang, Y. Guo, S. Meng, F. Feng, Highly selective determination of methylmercury with methylmercury-imprinted polymers., *Anal. Chim. Acta.* 575 (2006) 159–165..
- [5] Y. Liu, X. Chang, D. Yang, Y. Guo, S. Meng, Highly selective determination of inorganic mercury(II) after preconcentration with Hg(II)-imprinted diazoaminobenzene–vinylpyridine copolymers, *Anal. Chim. Acta.* 538 (2005) 85–91..
- [6] M. Firouzzare, Q. Wang, Synthesis and characterization of a high selective mercury(II)-imprinted polymer using novel aminothiols monomer., *Talanta.* 101 (2012) 261–266.
- [7] T. Yordanova, I. Dakova, K. Balashev, I. Karadjova, Polymeric ion-imprinted nanoparticles for mercury speciation in surface waters, *Microchem. J.* 113 (2014) 42–47..
- [8] S. Büyüktiryaki, R. Say, A. Denizli, A. Ersöz, Mimicking receptor for methylmercury preconcentration based on ion-imprinting., *Talanta.* 71 (2007) 699–705. 6.
- [9] Z. Wang, G. Wu, C. He, Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions, *Microchim. Acta.* 165 (2008) 151–157.
- [10] S. Xu, L. Chen, J. Li, Y. Guan, H. Lu, Novel Hg²⁺-imprinted polymers based on thymine-Hg²⁺-thymine interaction for highly selective preconcentration of Hg²⁺ in water samples., *J. Hazard. Mater.* 237-238 (2012) 347–54.
doi:10.1016/j.jhazmat.2012.08.058.

**Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species
(Talanta, 2016)**

Patente nº solicitud P201500704. Polímero para la inmovilización de especies de mercurio

**Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species
(Talanta, 2016)**

Patente nº solicitud P201500704. Polímero para la inmovilización de especies de mercurio



Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species

S. Zarco-Fernández^a, S. Montalvo-Quirós^a, M.J. Mancheño^{b,*}, C. Cámara^a, R. Muñoz-Olivas^{a,*}

^a Dto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Dto. Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Thiourea based polymer
Mercury species screening
Mercury pre-concentration
Direct Mercury Analyser

ABSTRACT

A new selective polymer has been developed (Patent: P201500704) with high mercury sorption capacity. The combination of this material with a Direct Mercury Analyser (DMA80) has overcome important limitations of this equipment for mercury determination of complex matrix samples, like high saline content, due to the ability of this material to selective and efficient mercury retention. Furthermore, application for fast screening of mercury species in food samples, like fish, is also presented. The polymer material has been synthesized by the precipitation technique, using Azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator, 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) as cross-linker, and 1-phenyl-3-(3-vinyl phenyl) thiourea as monomer. It has been characterized by SEM, TGA, FTIR, and binding isotherms have been established through Langmuir and Freundlich models. Selectivity has been proven by carrying out cross-reactivity experiments.

1. Introduction

Mercury exists in the environment in several chemical forms and states depending on physico-chemical parameters. Mercury concentration is changing as a result of anthropogenic activities; these changes have provoked a worldwide pollution problem [1]. The persistence of mercury in the environment, either as volatile form, Hg^0 , as water-soluble inorganic mercury, Hg^{2+} , and methylmercury, CH_3Hg^+ , is another major concern. Both, inorganic and organic mercury species are interconnected because the natural cycle of mercury maintains Hg^{2+} and CH_3Hg^+ in natural water resources, being subsequently accumulated in the food chain. CH_3Hg^+ is considered one of the best known neurotoxins: it can enter into the food chain due to its lipophilic character, then following bioaccumulation and biomagnification processes, finally leading to severe neurological damage to humans and wildlife [2,3].

Thus, mercury species content has to be continuously monitored and determined. Different analytical techniques, depending on the aim, can be used: for total mercury content, sensitive detection techniques as cold vapour atomic fluorescence (CV-AFS), absorption spectrometry (CV-AAS) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) are commonly employed [4–7]. However, for mercury speciation, chromatographic techniques are mostly employed (Gas Chromatography, GC or Liquid Chromatography, LC), generally coupled to ICP-MS [8–12]. Non-chromatographic techniques based

on the different chemical or physical Hg species behaviour (solubility, volatility or redox reactions) are sometimes also used [13–17]. All these methods require long and tedious sample pre-treatments prior to separation and detection [18]. The use of the Direct Mercury Analyser (DMA-80) for total mercury determination is a good alternative that has been proposed for trace mercury determination in complex matrices. This equipment can be employed to analyse solid and liquid samples without pre-treatment, providing an advantage when compared to the previously cited methods [19–22]. Its operation principles combine the sample thermal decomposition, followed by mercury catalytic reduction, and amalgamation on a gold system for vapour mercury trapping; afterwards mercury is desorbed and measured by atomic absorption spectrometry. However, some disadvantages are related with the sample homogeneity and the complexity of the matrix [23]. Samples with high saline content decrease the amalgam lifetime due to rusting. In addition, and considering the interest in Hg speciation, the main drawback of DMA-80 is the impossibility to discriminate between different mercury species, providing only information of the total amount of mercury.

Recently, we have developed a new polymeric material that allows speciation analysis, based on solid phase extraction in sequential steps, offering an alternative to chromatographic methods [24]. Based on those results, the aim of this study was to assess the capability and reliability to use this kind of polymeric materials, combined with a DMA-80, for the determination of Hg species. First, a new strategy for

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mjmreal@ucm.es (M.J. Mancheño), rimunoz@ucm.es (R. Muñoz-Olivas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.048>

Received 21 July 2016; Received in revised form 3 October 2016; Accepted 8 October 2016

Available online 15 October 2016

0039-9140/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

mercury screening speciation has been developed. Subsequently, the polymeric material has been employed for pre-concentration and analysis of seawater samples. In summary, a rapid and easy to use methodology for mercury determination has been achieved, combining a highly specific polymeric material with the DMA-80.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade and used without further purification: Azobisisobutyronitrile (AIBN), (Merck), 3-vinylaniline (Sigma-Aldrich), phenylisocyanate (Sigma-Aldrich, 98%), DMF (Sigma-Aldrich), Acetonitrile (Scharlau). DMF was dried over calcium hydride and THF over Na and were freshly distilled before use. Purification of the crude reactions was performed by flash column chromatography on Silica gel (Merck, 230–400 mesh), and the identification of products was made by thin layer chromatography (Kieselgel 60F-254). 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) was prepared as previously described [25]. Mercury standard stock solutions of Cl_2Hg (1000 mg L^{-1} prepared in Milli-Q water, Millipore, Ohio, USA) and CH_3HgCl (1000 mg L^{-1} prepared in methanol) were purchased from Alfa Aesar Karlsruhe, Germany. Both solutions were stored in amber glass at -18°C . Working solutions were daily prepared to reduce the risk of mercury volatilization. A tuna fish Certified Reference Material (BCR 464) with Hg certified contents was analysed.

2.2. Analytical equipment

Analysis was carried out with a Direct Mercury Analyser (DMA-80, Milestone Srl, Italy). Controlled heating stages are implemented to first dry and then thermally decompose a sample introduced into a quartz tube. A continuous flow of air carries the decomposition products through a catalyst bed where interferences, like halogens or nitrogen/sulfur oxides, are trapped. All mercury species are reduced to elemental Hg and are then carried along to a gold amalgamator where the mercury is selectively trapped. The system is purged and the amalgamator is subsequently heated to release all mercury vapors to the single beam, fixed wavelength atomic absorption spectrophotometer. Here, absorbance measured at 253.7 nm is proportional to mercury content in the sample (www.milestonesrl.com). A Thermo X Series 300 (Thermo Electron Corporation, USA) ICP-MS has been employed for multielemental analysis for polymer cross-reactivity experiments. ICP-MS optimized parameters are summarized in Table S1 (see Supporting Information). A Varian Vac Elut-20 solid phase extraction system with glass cartridge and PTFE frits supplied by J.T. Baker (Deventer, Holland) was employed to load Hg into the polymers for isotherms calculations and for cross-reactivity experiments. The scanning electron micrographs were recorded using a SEM Hitachi S4500. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using SDT-600 equipment. IR spectra were taken on a Brüker Tensor 27 ($\text{MIR } 8000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$) Fourier Transformed Infrared Spectrometer.

2.3. Synthesis of the polymer

The synthesis is described in Fig. 1. The precipitation synthesis method was employed: briefly, 1-phenyl-3-(3-vinylphenyl) thiourea (Monomer) react with 2-(Methacryloylamino) ethyl 2-Methyl Acrylate (NOBE) (Cross-linker) in the presence of AIBN as polymerization initiator and acetonitrile as solvent at 65°C under nitrogen atmosphere for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the polymer was washed with water and methanol. The complete description of the procedure has been included in the Supporting Information [26,27].

2.4. Adsorption isotherms

The binding isotherms were performed using Langmuir and Freundlich models [28,29]. Both models give the relationship between the analyte specifically bound (B) and the not retained or free (F). Langmuir equation based on adsorption occurs in homogeneous monolayer, while Freundlich equation, the adsorption occurs in heterogeneous surface. In both cases the equations can be rearranged to linear form as:

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{aN_T F} + \frac{1}{N_T} \text{Langmuir model} \quad (1)$$

$$\ln B = m \ln F + \ln a \text{ Freundlich model} \quad (2)$$

where N_T ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and a (μM^{-1}) are Langmuir constants related to adsorption capacity and affinity constant, respectively. B ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and F (μM) are the amount of Hg adsorbed and non-adsorbed equilibrium concentrations, respectively. Freundlich parameters a , B and F are the same parameters as before, and m is the heterogeneous grade ($m=1$ homogeneous and $m=0$ is heterogeneous). About 50 mg of polymer precisely weighted were placed in different glass solid-phase extraction (SPE) cartridges provided with PTFE frits. Then, Hg^{2+} and CH_3Hg^+ were loaded in an amount rate from 1 to 10^7 ng and the sample was left to reach the equilibrium. Elution of free mercury (F) was performed at a flow rate around 1 mL min^{-1} . Analysis was performed by adding 100 μL of the outgoing solution of the extraction cartridges into the DMA-80 quartz cuvette and applying the standard heating procedure.

2.5. Total Hg analysis and Screening of mercury species

DMA-80 calibration was conducted according to EPA 7473 [30]. Such calibration was performed analyzing Hg^{2+} standards at the concentration range 0–40 ng leading to detection and quantification limits for these direct measurements of 0.5 and 1.5 ng, respectively. The same amount of mercury standards were loaded employing a SPE device into cartridges filled with the polymer. Three replicates of 10 mg of the loaded polymer were introduced into the DMA-80 quartz cuvette to apply, either, the standard procedure for total Hg analysis or the two-steps procedure for Hg species screening (see Results section). Operating conditions of DMA-80 are summarized in Table 1 pH studies were performed in order to know the influence in retention, finding similar values between $3 > \text{pH} < 7$, although the sorption data were not significantly different.

2.6. Samples collection and pretreatment

Seawater samples were collected at *Guardamar del Segura* location, Spain. The samples were collected in polyethylene bottles, filtered through nylon filters of $0.45 \mu\text{m}$ pore size (Millipore), transferred to glass bottles, and kept in a refrigerator at 4°C until use. Recovery studies were performed by spiking the seawater samples with Hg^{2+} standard due to the extremely low Hg concentration in the monitored samples that unable to detect it directly. Extraction of mercury species from tuna fish purchased at a local supermarket and CRM samples was performed in 0.1g dried sample by adding 5 mL of 5 M HCl and applying ultrasound energy in an ultrasonic bath for 30 min. Supernatants were separated from solid by centrifugation, diluted with water in order to reduce acidity before loading into 50 mg of polymer. Such dilution is performed to prevent structural damage of the polymer due to the high amount of HCl (5 M) employed for compounds extraction. Total mercury content was determined in another sample by applying microwave acid digestion, 0.1g dry sample plus 5 mL nitric acid and 2 mL hydrogen peroxide for comparison purposes. Each sample was performed in replicates of three.

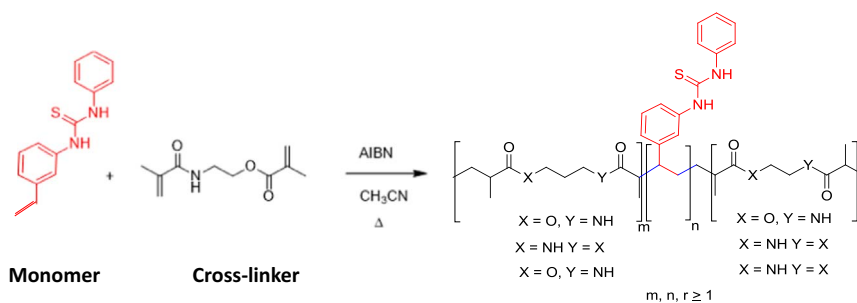


Fig. 1. Synthesis of the thiourea derivative polymer.

Table 1

DMA-80 experimental conditions for inorganic and CH_3Hg (I) determination.

Parameter	Hg (II)	CH_3Hg (I)
T ^a opening system	250 °C	50 °C
Descomposition temperature	600 °C	120 °C
Descomposition time	120 s	120 s
Purge time	60 s	60 s
Amalgamator temperature	900 °C	900 °C
Amalgamator time	12 s	12 s
Signal registering time	30 s	30 s

3. Results and discussion

3.1. Polymers characterization

The micrographs performed at a scale of 100 nm had the purpose to

evaluate both morphology and size (Fig. 2a), obtaining uniform particle agglomerates around 100 nm diameter-sized. The thermal stability was studied by thermogravimetric analysis (TGA), increasing the temperature from room temperature up to 700 °C at a rate 100 °C min⁻¹ (Fig. 2b). The polymer starts its decomposition at 80 °C around but at a low rate (5%) and remained stable up to 140–150 °C, showing from them gradual decomposition until 450 °C, temperature at which it appeared mostly decomposed (90% weight loss) [31]. This result assured a successful use of the polymer in combination with the DMA-80 desorption thermal procedure for both total Hg analysis and species screening. Temperature for total Hg decomposition applied is 600 °C, at which the polymer is totally decomposed; however, Hg has been volatilized and trapped by the amalgam much earlier. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy analysis showed a broad signal around 3421 cm⁻¹ that can be assigned to NH of the amide group, as well as stretching frequencies at 1725 and 1652 cm⁻¹, that can be assigned to the esters and amide groups present in the polymer

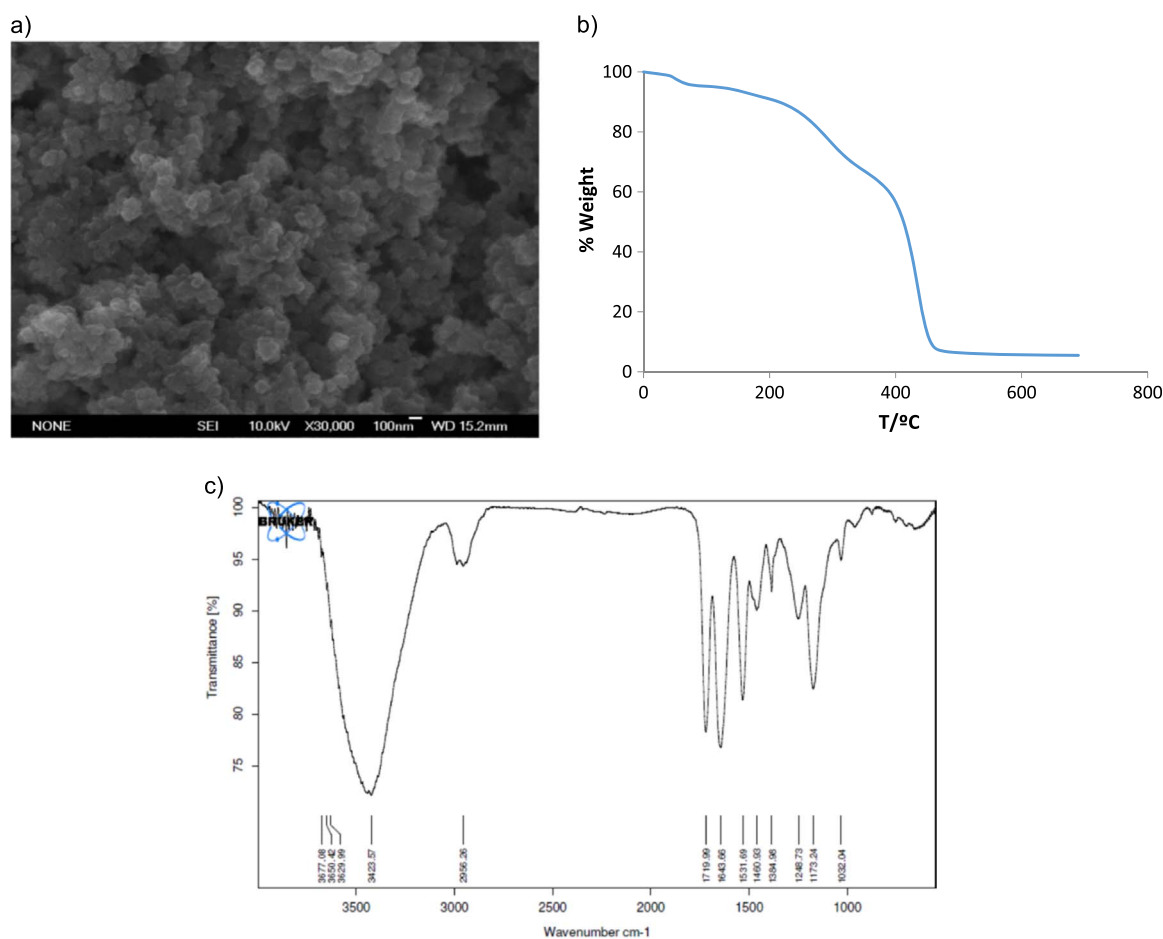


Fig. 2. a) Scanning electron microscopy at 100 nm scale; b) Thermogravimetric analysis; c) FTIR analysis.

Table 2
Langmuir and Freundlich parameters and coefficient constants.

	Langmuir			Freundlich		
	Parameters	Hg (II)	MeHg (I)	Parameters	Hg (II)	MeHg (I)
P2	N_T ($\mu\text{mol/g}$)	380	20	a (mM^{-1})	23	8
	a (mM^{-1})	40	195	m	0,91	0,89
	R^2	0,9945	0,9973	R^2	0,9434	0,9424

backbone consisting mainly of acrylamide units (Fig. 2c).

3.1.1. Adsorption isotherms

Inorganic and methyl mercury adsorption data were calculated with the two models previously described. The plots constructed with experimental data for the calculation of binding isotherms have been included in the SI, Figs. S-2I, and S-2II. The parameters and correlation coefficients have been summarized in Table 2, showing high affinity for mercury ions. The values of the correlation coefficients obtained from Langmuir expression are higher than 0,99 and fit better than Freundlich model presuming that adsorption phenomena occurs in homogeneous monolayer. Adsorption capacity (N_T) for Hg^{2+} , 380 $\mu\text{mol g}^{-1}$, has resulted comparable to other published values: 339 $\mu\text{mol g}^{-1}$ [35], and lower to the best value of the revised bibliography, 1409 $\mu\text{mol g}^{-1}$ [33]. These data cannot be strictly compared as we could not saturate the polymer after loading 1000 mg g^{-1} . Then, we compared the maximum adsorption capacity (Cs) calculated as the maximum Hg^{2+} adsorbed per mg of polymer. These data have been represented versus the Langmuir affinity constant obtained after isotherm calculations (Fig. 3). We can see that Cs value is now higher than the other studies and similar to our previous paper published [24]. A quick look at the graph reveals the great maximum capacity obtained by our material that can be attributed to the presence of sulfur atoms [38–40], indeed strong thiophilicity is an important feature of Hg^{2+} that may separate it from other common metal ions, as well as the amides contained in the cross-linker employed [25,31,41]. In addition, we report the only adsorption parameters published so far today for CH_3Hg^+ that is noticeably lower than for Hg^{2+} as the lipophilicity of this compound can partially inhibit its retention by the thiol groups. From this same figure, the Langmuir affinity constant, “a”, indicate similar affinity to several other papers, but not as good as some nanoparticle ion-imprinted sorbents reported by Yordanova et al. [34] employing 1-pyrrolidinedithiocarboxylic acid as chelating agent to generate the specific sites. These results are not surprising as the ion-imprinted polymers are characterized by high selectivity of the materials obtained. However, the maximum capacity reached for the thiourea derivative presented here is 1000 fold above. In order to better know the selectivity of our polymer, some cross-reactivity experiments

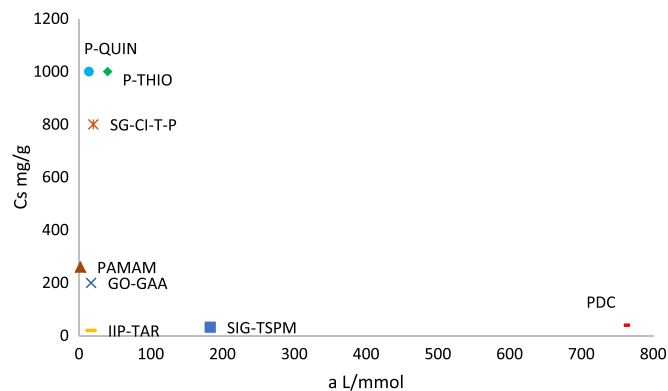


Fig. 3. Comparing values of maximum retention capacity for different materials including the polymer presented in this work: P-THIO, P1-QUIN [24], PDC [34], IIP-TAR [37], SIG-TSPM [36], SG-CI-T-P [35], GO-GAA [33] and PAMAM [32].

Table 3
Cross reactivity parameters of Hg adsorption in presence of for several trace elements.

Metal ions	K_d (mL g^{-1})	k
Hg (II)	388	–
As (V)	160	2,4
Cd (II)	204	1,9
Pb (II)	216	1,8

have been performed.

3.1.2. Cross-reactivity

selectivity towards mercury species has been checked by measuring other potential competitive cations like Cd (II), Pb (II), As (V) and Se (VI) at the same concentration level as Hg (II). These ions were added together with inorganic and methyl mercury and the outgoing solutions were measured by ICP-MS. Distribution coefficient K_d , and selectivity coefficient k , have been calculated according to Eqs. (3) and (4). [42,43]

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \frac{V}{m} \quad (3)$$

$$k = \frac{K_d(\text{Hg})}{K_d(M)} \quad (4)$$

where C_i and C_f are initial and final concentrations of metals; V is the volume of solution used and m is the mass of sorbent employed. Values of such coefficients, summarized in Table 3, confirmed the selectivity for mercury ions in the presence of concomitant elements displayed by the k values, higher than 1 in all cases. According to these experiments, and in order to evaluate likely competitive effects of other common ions that could be present in many samples of interest, were also evaluated by loading Cu, Zn, Fe and Ni at 50 fold and major ions, Na, K, Ca, Mg, at 500 fold. In all cases, Hg sorption was unaffected reaching $97 \pm 2\%$ retention. Most retained ions other than Hg by this material was Cd^{2+} at a rate of 50% due to their similar chemical properties; retention for all other divalent cations fall around 35% in case of Pb^{2+} or much less for Mg^{2+} and Ca^{2+} , as expected because these ions are not supposed to have any affinity for the thiol groups; Na^+ and K^+ kept at 20% of the loaded concentration. These results evidenced the excellent adsorption capacity as well as great selectivity towards Hg of the material presented.

3.2. Optimization of DMA-80 combined with the proposed polymeric material

3.2.1. Mercury determination in saline matrices

mercury content in seawater is within ng L^{-1} level [44]. As most analytical methods do not provide enough sensitivity to detect these low mercury concentration, a pre-concentration step is usually required previous to mercury determination. Taking into account that 0,5 ng as the obtained detection limit by a direct use of DMA-80, the method cannot attain those environmental values. If we consider usual Hg concentration in these matrices, 10 ng L^{-1} , and 500 μL as the maximum sample volume that can be introduced at once means 0.005 ng, far from the DL of the equipment. In addition, direct analysis of seawater samples would lead to catalyze rusting reducing considerably its lifetime. This fact can be insight by looking at the salted residue remaining in the quartz cuvettes after directly burning seawater (Fig. 4). In fact, the interferences caused by salts led to Hg recoveries less than 20% by following this approach.

For this purpose, seawater collected at Guardamar del Segura, Spain, was spiked with 10 ng L^{-1} Hg^{2+} and 1000 mL were loaded into 50 mg of the polymer without any pre-treatment other than applying a clean-up step with Milli-Q water after loading the sample in order to

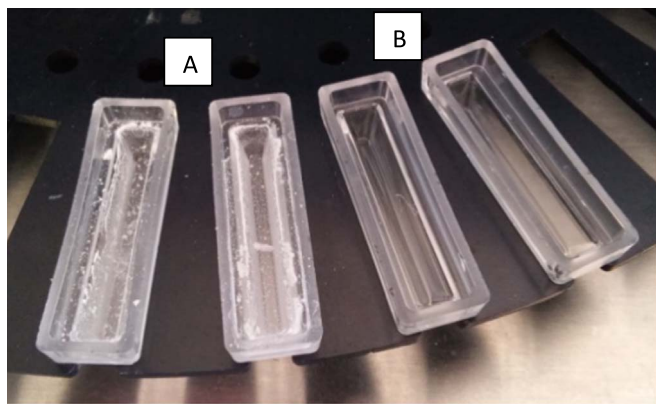


Fig. 4. Quartz cuvettes appearance after a) burning 100 μL seawater; b) burning 100 μL Milli-Q water.

remove potential interfering salts, mainly chlorides. Then, replicates of 10 mg of the Hg-loaded-polymer were introduced into the DMA-80 and the standard heating procedure for total Hg analysis was applied. Recoveries were in the range $92 \pm 6\%$, meaning quantitative analysis and total absence of interferences from concomitant ions and salts present in this complex matrix. Considering the recovery and that no breakthrough volume effect was observed, an excellent pre-concentration factor of 300 has been achieved, leading to a quantification limit of 0,005 ng and detection limit of 0.0015 ng more than enough to perform analysis of Hg in seawater. Reproducibility of 5% was achieved ($n=6$ measured in two different days). These results are very convenient not only for seawater analysis, but for other liquid samples where high salinity is one of the main drawbacks for the system due to rusting produced by salts. This second approach makes the synthesized polymer highly versatile for high sensitive environmental Hg analysis in saline matrices.

3.2.2. Mercury species screening

As stated before, one of the aims of this work was to combine the pre-designed polymeric material with DMA-80, in order to establish a methodology for fast mercury species screening. Thus, an evaluation of the polymer homogeneity after Hg loading was preliminary tested. Such study was carried out by loading 25 ng of Hg^{2+} or CH_3Hg^+ into 50 mg of the polymer. Then, 50, 30 or 10 mg of the corresponding Hg-loaded polymer were introduced into the DMA-80 device by means of quartz cuvettes, and the described procedure in the experimental section was applied. The reproducibility obtained for 3 replicates for the different amounts of polymer tested, was less than 10% in all cases. Therefore, further analysis was performed using 10 mg of polymer, in order to provide a cost-effective and environmentally friendly method.

The next step was to optimize the temperature ramps needed to carry out an effective and sequential desorption of the different mercury species loaded into the polymer. Methylmercury release temperature was firstly checked, and temperature values from 90 to 120 $^\circ\text{C}$ were studied. Best CH_3Hg^+ recovery was obtained at 120 $^\circ\text{C}$ keeping this value as the optimum. Once optimization for CH_3Hg^+ was achieved, the equipment standard ramp (up to 600 $^\circ\text{C}$) was applied for Hg^{2+} detection. Under these conditions, the recovery percentage of retained inorganic mercury was $98 \pm 5\%$ and $90 \pm 6\%$ for methylmercury. The data obtained would allowed us to define an efficient procedure for a subsequent effective determination of Hg species.

Then, in order to determine the scope of the method, extracts from 464 CRM and from tuna fish were loaded into the polymer, resulting in recoveries from 85% to 95% as sum of Hg species by applying the two-step heating procedure (being 100% the certified value for 464 CRM analysis or the value obtained after digestion of the tuna sample). Looking closer to the Hg species recoveries, a maximum recovery of 50% from the CH_3Hg^+ present in the sample has been obtained in the

first step, being the rest presumably measured in the second step together with Hg^{2+} . This drawback disabled the quantification of each species. However, we propose a rapid screening to determine the CH_3Hg^+ presence in food matrices analysis by using the above mentioned methodology. This proposal combines sample adsorption on our polymer and DMA-80 determination as a way to rapid and easy discriminate the presence or not of CH_3Hg^+ , especially in those samples where legislation levels for this compound has been established, the case for fish samples. Whereas the quantification of both species is needed, other approaches could be attained. For instance, speciation by using the standard operation procedure proposed by EU which consists of CH_3Hg^+ back-extraction into cysteine and DMA determination [45], or alternatively the SPE procedure previously developed and already published [24].

4. Conclusions

A polymer based on thiourea derivative monomer has been developed for mercury species sorption with high capacity and selectivity towards mercury ions. The sorbent has been used combined with DMA-80 to provide a fast, clean and simple sensitive method for Hg determination. The work has been devoted to total Hg analysis in high saline matrices at very low concentrations by means of an excellent pre-concentration factor. Finally, modification of DMA-80 parameters in combination with these polymers allowed performing a fast and simple screening of Hg species. This approximation represents an attractive alternative, in terms of time saving and handling as well as environmentally friendly due to the little or inexistent sample pretreatment needed.

Acknowledgements

This research was supported by the Comunidad Autónoma of Madrid, Spain, (Project S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2016.10.048.

References

- [1] W.C. Li, H.F. Tse, Health risk and significance of mercury in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (2015) 192–201. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3544-x>.
- [2] M. Gochfeld, Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2003) 174–179. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00060-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00060-5).
- [3] F. Zahir, S.J. Rizwi, S.K. Haq, R.H. Khan, Low dose mercury toxicity and human health, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (2005) 351–360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2005.03.007>.
- [4] A.P.N. Neto, L.C.S.M. Costa, A.N.S. Kikuchi, D.M.S. Furtado, M.Q. Araujo, M.C.C. Melo, Method validation for the determination of total mercury in fish muscle by cold vapour atomic absorption spectrometry, *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29 (2012) 617–624.
- [5] G.H. Tao, S.N. Willie, R.E. Sturgeon, Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion, *Analyst* 123 (1998) 1215–1218.
- [6] N. Miekeley, M.O. Amato, Fast Hg determination in biological samples by ICP-MS using minute furnace catalytic combustion (MFCC), *At. Spectrosc.* 18 (1997) 186–191.
- [7] S. D'Ilio, C. Majorani, F. Petrucci, N. Violante, O. Senofonte, Method validation for the quantification of As, Cd, Hg and Pb in blood by ICP-MS for monitoring purposes, *Anal. Methods* 2 (2010) 2049–2054.
- [8] B. Bouyssiere, F. Baco, L. Savary, R. Lobiński, Speciation analysis for mercury in gas condensates by capillary gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 431–439. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01151-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01151-2).
- [9] J.H. Huang, Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(*n*-propyl)borate, *Anal. Chim. Acta* 532 (2005) 113–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.057>.
- [10] A.V. Zmozinski, S. Carneado, C. Ibáñez-Palomino, Á. Sahuquillo, J.F. López-

- Sánchez, M.M. da Silva, Method development for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in seafood, *Food Control* 46 (2014) 351–359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.054>.
- [11] S. Döker, İ.İ. Boşgelmez, Rapid extraction and reverse phase-liquid chromatographic separation of mercury(II) and methylmercury in fish samples with inductively coupled plasma mass spectrometric detection applying oxygen addition into plasma, *Food Chem.* 184 (2015) 147–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.067>.
- [12] L. Schmidt, C. a. Bizzi, F. a. Duarte, E.I. Muller, E. Krupp, J. Feldmann, et al., Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish, *Food Control* 47 (2015) 413–419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.040>.
- [13] B. Díaz de Greñu, J. García-Calvo, J. Cuevas, G. García-Herbosa, B. García, N. Busto, et al., Chemical speciation of MeHg⁺ and Hg²⁺ in aqueous solution and HEK cells nuclei by means of DNA interacting fluorogenic probes, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3757–3764. <http://dx.doi.org/10.1039/C5SC00718F>.
- [14] H.R. Lotfi Zadeh Zhad, R.Y. Lai, A Hg(II)-mediated “signal-on” electrochemical glutathione sensor, *Chem. Commun.* 50 (2014) 8385–8387. <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc03329a>.
- [15] L. Deng, X. Ouyang, J. Jin, C. Ma, Exploiting the higher specificity of silver amalgamation: selective detection of mercury (II) by forming Ag/Hg amalgam, *Anal. Chem.* 85 (2013), 2013, pp. 8594–8600. <http://dx.doi.org/10.1021/ac401408m>.
- [16] Y. Li, S. Sun, J. Yang, Y. Jiang, Label-free DNA hybridization detection and single base-mismatch discrimination using CE-ICP-MS assay, *Analyst* 136 (2011) 5038. <http://dx.doi.org/10.1039/c1an15592j>.
- [17] M.R. Cenzano, O. López-Salazar, M. Cervera, M. de la Guardia, Non-chromatographic speciation of mercury in mushrooms, *Anal. Methods* (8) (2016) 1774–1779.
- [18] E. Ramalhosa, S. Río-Segade, Analytical methods for mercury speciation in several matrices: a review, *Trends Chromatogr.* 2 (2008) (accessed 25.06.15) <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/3605>.
- [19] H.P. Vieira, C.C. Nascentes, C.C. Windmöller, Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey, *J. Food Compos. Anal.* 34 (2014) 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.02.001>.
- [20] C. Maggi, M.T. Berducci, J. Bianchi, M. Giani, L. Campanella, Methylmercury determination in marine sediment and organisms by direct mercury analyser, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 32–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.033>.
- [21] G. Carbonell, J.C. Bravo, C. Fernández, J.V. Tarazona, A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 210–213. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-009-9720-x>.
- [22] R.F.L. Ribeiro, A. Germano, Development and validation of a method for the determination of Hg in animal tissues (equine muscle, bovine kidney and swine kidney, and poultry muscle) by direct mercury analysis (DMA), *Microchem. J.* 121 (2015) 237–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.03.005>.
- [23] C.F. Tsai, D.Y.C. Shih, Y.T. Shyu, Survey of total mercury in foods from Taiwan containing red mould rice (*Monascus*) using a direct mercury analyser (DMA), *Food Addit. Contam. Part B* 3 (2010) 84–89. <http://dx.doi.org/10.1080/19440041003772953>.
- [24] S. Zarco-Fernández, M.J. Mancheño, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, A new specific polymeric material for mercury speciation: application to environmental and food samples, *Anal. Chim. Acta* 897 (2015) 109–115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.016>.
- [25] M. Sibrian-Vazquez, D. a. Spivak, Enhanced enantioselectivity of molecularly imprinted polymers formulated with novel cross-linking monomers, *Macromolecules* 36 (2003) 5105–5113. <http://dx.doi.org/10.1021/ma025710z>.
- [26] N. Silica, T. Sangvanich, J. Morry, C. Fox, W. Ngamcherdtrakul, S. Goodyear, et al., Novel oral detoxifi cation of mercury, cadmium, and lead with thiol-modifi ed nanoporous silica, *Appl. Mater Interfaces* (2014) 5483–5493.
- [27] L. Ciszewski, D. Xu, O. Repič, T.J. Blacklock, Reductive alkylation of thioureas: a highly practical synthesis of unsymmetrical N,N'-disubstituted thioureas, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 8091–8093. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.08.182>.
- [28] H.M.F. Freundlich, Over the adsorption in solution, *J. Phys. Chem.* 57 (1906) 385–470.
- [29] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. solids, *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. <http://dx.doi.org/10.1021/ja02268a002>.
- [30] Method 7473, “Mercury in Solids and Solution by Thermal Decomposition, Amalgamation and Atomic Absorption Spectrophotometry,” 2007.
- [31] M. Firouzzare, Q. Wang, Synthesis and characterization of a high selective mercury(II)-imprinted polymer using novel aminothioliol monomer, *Talanta* 101 (2012) 261–266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.023>.
- [32] Y. Niu, J. Yang, R. Qu, Y. Gao, N. Du, H. Chen, et al., Synthesis of Silica-Gel-Supported Sulfur-Capped PAMAM Dendrimers for Efficient Hg(II) Adsorption: experimental and DFT Study, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 3679–3688. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00172>.
- [33] K. Aghdam, H.A. Panahi, E. Alaei, A.H. Hasani, E. Moniri, Preparation of functionalized graphene oxide and its application as a nanoadsorbent for Hg₂₊ removal from aqueous solution, *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016). <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5226-2>.
- [34] T. Yordanova, I. Dakova, K. Balashev, I. Karadjova, Polymeric ion-imprinted nanoparticles for mercury speciation in surface waters, *Microchem. J.* 113 (2014) 42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.11.008>.
- [35] F. Cao, P. Yin, X. Liu, C. Liu, R. Qu, Mercury adsorption from fuel ethanol onto phosphonated silica gel prepared by heterogeneous method, *Renew. Energy* 71 (2014) 61–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.05.028>.
- [36] I. Dakova, T. Yordanova, I. Karadjova, Non-chromatographic mercury speciation and determination in wine by new core – shell ion-imprinted sorbents, *J. Hazard. Mater.* 231–232 (2012) 49–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.034>.
- [37] D.K. Singh, S. Mishra, Synthesis and characterization of Hg(II)-ion-imprinted polymer: kinetic and isotherm studies, *Desalination* 257 (2010) 177–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.02.026>.
- [38] Z. Wang, G. Wu, C. He, Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions, *Microchim. Acta* 165 (2008) 151–157. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-008-0113-3>.
- [39] T. Wajima, K. Sugawara, Adsorption behaviors of mercury from aqueous solution using sulfur-impregnated adsorbent developed from coal, *Fuel Process. Technol.* 92 (2011) 1322–1327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.02.008>.
- [40] D. Nagai, T. Daimon, S. Kawakami, K. Inoue, High-recovery material for mercury ions based on a polyallylamine hydrogel with thiourea groups at cross-linking points, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3300–3304. <http://dx.doi.org/10.1021/ie403118b>.
- [41] D. Riccardi, H. Guo, J.M. Parks, B. Gu, A.O. Summers, S.M. Miller, et al., Why Mercury Prefers Soft Ligands, *Phys. Chem. Lett.* 4 (2013) 2317–2322.
- [42] M. Andaç, S. Mirel, S. Senel, R. Say, A. Ersöz, A. Denizli, Ion-imprinted beads for molecular recognition based mercury removal from human serum, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 159–166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.07.002>.
- [43] Y. Liu, X. Chang, D. Yang, Y. Guo, S. Meng, Highly selective determination of inorganic mercury(II) after preconcentration with Hg(II)-imprinted diazoamino-benzene-vinylpyridine copolymers, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 85–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.017>.
- [44] H. Javed, M. Javed, Mercury concentrations in environment: a cause of concern for human health, *Int. J. Biol. Biol. Sci.* 2 (2013) 114–121.
- [45] J. Calderon, S. Gonçalves, F. Cordeiro, B. de la Calle, Determination of Methylmercury in Seafood by Direct Mercury Analysis: Standard Operating Procedure, IMEP-115, EUR 25830 EN 2013, 2013.

Supporting Information

Development of a thiourea derivative polymer combined to a Direct Mercury Analyser for screening and pre-concentration of mercury species

S. Zarco-Fernández¹, S. Montalvo-Quirós¹, M.J. Mancheño^{2*}, C. Cámara¹, R. Muñoz-Olivas^{1*},

¹Dto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

²Dto. Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Corresponding author: rimunoz@ucm.es; mjmreal@ucm.es

General Procedures

A flame dried glassware and standard Schlenk techniques were used for moisture-sensitive reactions. DMF was dried over calcium hydride and THF over Na and were freshly distilled before use. Purification of the crude reactions was performed by flash column chromatography on Silica gel (Merck, 230-400 mesh), and the identification of products was made by thin layer chromatography (kieselgel 60F-254). UV light ($\lambda = 254$ nm) and 5% phosphomolybdic acid solution in 95% EtOH were used to develop the plates. NMR spectra were recorded at 22°C in CDCl₃ on Bruker Advance DPX 300 (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts are given in ppm relative to CDCl₃ (7.26 ppm for ¹H; 77.0 ppm for ¹³C). The splitting patterns are designated as follows: s = singlet, d = doublet, m = multiplet, bs = broad signal. IR spectra were taken on a Bruker Tensor 27 (MIR 8000-400 cm⁻¹) spectrometer. MS experiments (EI) were carried out on a MAT95 XP spectrometer.

Synthesis of Monomer 1-phenyl-3-(3-vinyl phenyl) thiourea

To a THF (10 mL) phenylisocyanate solution (1.1 mmol) was added 3-vinylaniline (1 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. Solvent was removed under vacuum and the resulting mixture was purified using flash chromatography on silica gel. (Hexanes: DCM). The product was obtained a viscous white liquid (90%).

¹H NMR(CDCl₃): 7.79 (bs, 2 H, NH), 7.45-7.26 (m, 9 H, ArH), 6.69 (dd, $J = 17$, $J = 11$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5.31 (d, $J = 17$ Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): 139.0, 137.4, 137.1, 135.8, 129.5, 129.4, 126.9, 125.1, 124.7, 124.4, 122.8. IR (DCM): 3361, 3175, 3044, 1596, 1582, 1524, 1493, 1262, 730, 692 cm⁻¹. MS (EI): 254.09 (M⁺, 36%), 228.1 (61%), 161 (63%), 135 (77%), 119 (81%), 93 (100%), 77 (85%).

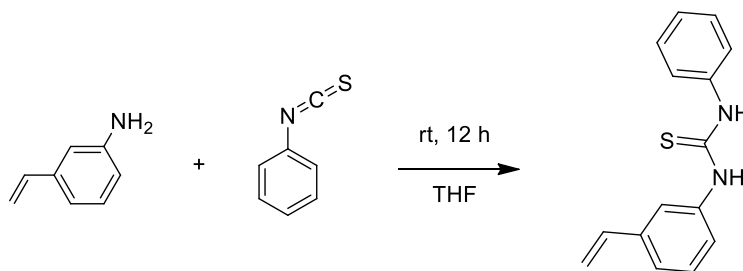


Figure S1: Thiourea derivate synthesis

Synthesis of the polymer

Polymer synthesis was performed by the precipitation technique. In an amber glass vessel Monomer (0,13 mmol) was dissolved in 4 mL of acetonitrile. Then, Cross-linker (NOBE, 600 mg, 3 mmol) and AIBN, as initiator, were added under nitrogen atmospheric. The reaction mixture was kept in a silicone bath at 65°C and stirred 24 h, until completion of the polymerization process. The solvent was evaporated and the solid was washed with water and MeOH by centrifugation (8000 rpm, 10 min), the supernatant was removed and the solid dried to yield pure polymers.

Binding isotherm experiment

Langmuir and Freundlich models have been plotted with the experimental data

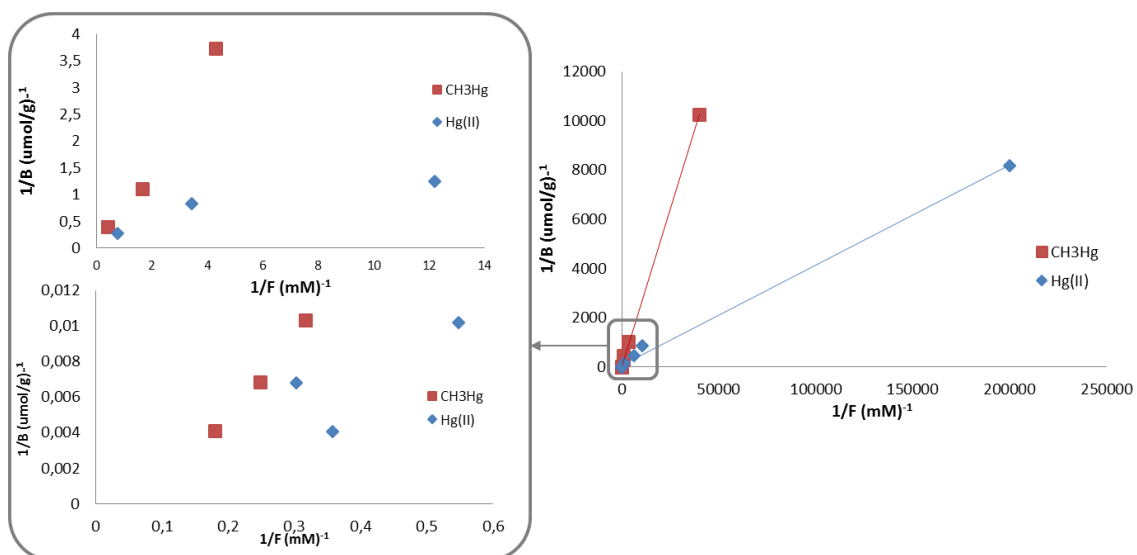


Figure S2-I: Langmuir isotherm.

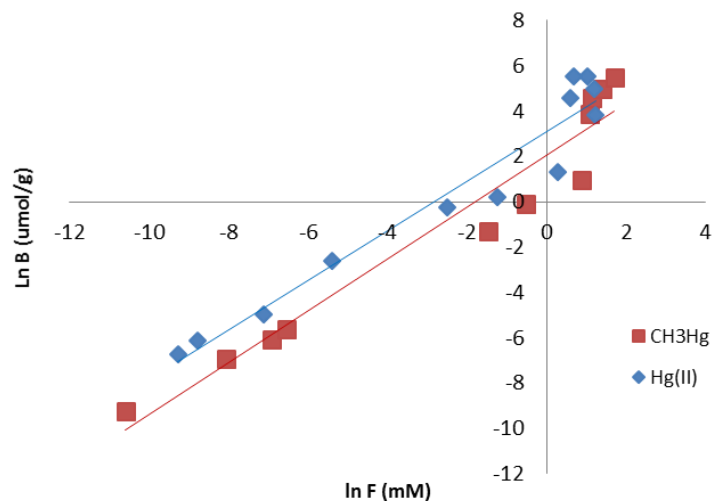


Figure S2-II: Freundlich isotherm

Experimental parameters for ICP/MS

ICP/MS parameters	
RF Power (W)	1200
Plasma gas (Ar) flow rate (L.min ⁻¹)	15.0
Auxiliary gas (Ar) flow rate (L.min ⁻¹)	0.30
Carrier gas (Ar) flow rate (L.min ⁻¹)	1
Nebulizer Type	Conikal
Cones	Ni
Spray Chamber cooled by Peltier system	2 °C

Table S1: Experimental parameters for ICP/MS

Attached

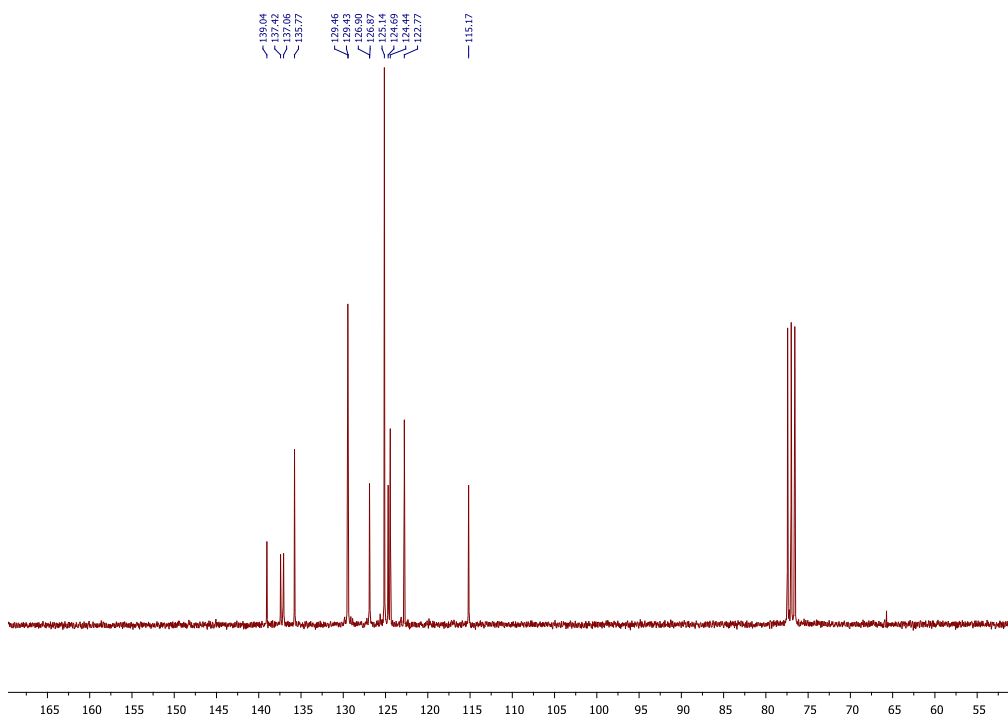
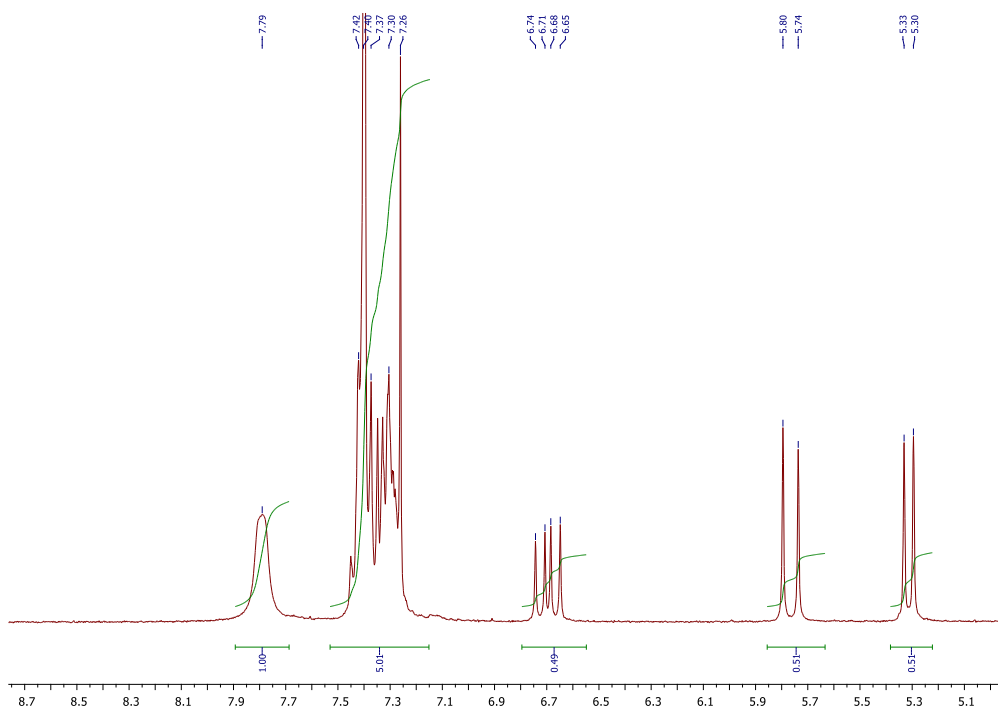


Figure SII-III. Spectra of **Monomer**: ^1H NMR and ^{13}C NMR of 1-phenyl-3-(3-vinyl phenyl)thiourea

DESARROLLO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA Y ACUMULACION DE ARSÉNICO

En los comienzos de la historia de la Tierra, el arsénico formaba parte de la atmósfera reductora que la envolvía, siendo el arsenito la forma química más abundante. Estas condiciones obligaron a los organismos a desarrollar diferentes estrategias para eliminar el arsenito. Sin embargo, cuando el oxígeno empezó a acumularse en la atmósfera la mayoría del arsenito se oxidó a arseniato sin que los organismos tuvieran ninguna estrategia para tolerarlo. Por ello, la arseniato reductasa que reduce el arseniato a arsenito se consideró una enzima fundamental para garantizar la supervivencia de los organismos vivos. La arseniato reductasa juega, por tanto, un papel muy importante en la tolerancia de las plantas a arsénico apareciendo como un factor crítico para su adaptación en suelos y medios acuosos contaminados. En el contexto de esta tesis doctoral hemos determinado que las fitohormonas y más concretamente las citoquininas, participan en la tolerancia de las plantas a concentraciones elevadas de arsénico.

Para llevar a cabo estos estudios, se ha utilizado como organismo modelo la planta *Arabidopsis thaliana*. Sobre este modelo se ha analizado la tolerancia a arseniato en plantas que tienen alterados los niveles endógenos de citokininas mediante la expresión en plantas transgénicas de la citoquinina oxidasa/deshidrogenasa 1 (ckx1), que degrada las citoquininas endógenas.

Se han desarrollado dos trabajos que nos han permitido determinar la actividad de una nueva arseniato reductasa y analizar la implicación de algunas fitohormonas en el aumento de la tolerancia de las plantas hacia el arsénico. Los resultados obtenidos han sido fruto de la colaboración de dos grupos de investigación con disciplinas muy diferentes. Los estudios genéticos han sido realizados conjuntamente entre el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid y el Departamento de Genética Molecular en Plantas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC. Todo el trabajo analítico, tratamiento de las muestras, determinación de As total, especiación, y estudios cinéticos, ha sido desarrollado como trabajo experimental de esta tesis.

En el primer trabajo titulado "*Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in Arabidopsis thaliana*", mediante un escrutinio de la tolerancia a arseniato de una colección de genes de *Arabidopsis thaliana* se identificó un rasgo cuantitativo QTL cuyo gen responsable codifica para una arseniato reductasa. En nuestro laboratorio determinamos en medios hidropónicos de plantas de *Arabidopsis*

thaliana, crecidas en presencia de As (V), la capacidad reductora de arseniato y la capacidad acumuladora de arsénico en estos genes tolerantes y sensibles a arseniato. Todo esto permitió demostrar que la proteína identificada, AtARQ1 responsable de la variabilidad genética natural, codifica para una arseniato reductasa relacionada con la tolerancia al arsénico y su adaptación al estrés químico medioambiental. El papel de esta proteína coincide con el aumento de la actividad de As (V)-reductasa observada en plantas hiperacumuladoras, provocando un aumento en la capacidad de reducir As(V) a As (III), acompañada de un elevado poder acumulativo de dicho elemento. Tras el análisis del contenido total de arsénico y de la producción de As (III), se observó que las plantas transforman un tercio del As (V) que absorben del medio. Por otro lado, la medida de la producción de As (III) a partir de distintas concentraciones de As (V) permitió determinar la constante cinética de Michaelis-Menten. Además, la identificación de un rasgo cuantitativo (QTL) de AtARQ1 y la de varios polimorfismos funcionales indicaron una considerable complejidad en la variación natural y en la evolución de un metabolismo secundario del As (V). Estos resultados sugieren una adaptación de estas plantas a medios ricos en As (V) lo que podría implicar su empleo en estrategias de fitorremediación.

En el segundo trabajo “*Cytokinin Determines Thiol-Mediated Arsenic Tolerance and Accumulation*”, se ha observado que las citoquininas (ck) modulan la desintoxicación del arsénico en plantas. Para ello, se han utilizado 3 líneas de *Arabidopsis thaliana*: a) variedad que expresa constitutivamente la *ckx1*, con niveles de ck fuertemente disminuidos; b) línea con reducción en la síntesis de ck (*cyp*) y c) plantas control sin modificar (wild type). El fenotipo de tolerancia al arsénico en plantas con las ck disminuidas sugieren que estas fitohormonas coordinan mecanismos de desintoxicación. La tolerancia se consigue a través la acción combinada de dos respuestas específicas: la prevención de la absorción de As (V) por represión del transportador PHT1,1 y mediante la eliminación del As (III) a través de la formación de complejos con las fitoquelatinas (PCs) quedando secuestrado en vacuolas.

La disminución de las citoquininas endógenas en respuesta al As (V) altera la expresión de los genes involucrados en la detoxificación del arsénico. Estos genes incluyen aquéllos que están relacionados con la biosíntesis de PCs y los que regulan a la enzima de arseniato reductasa AtARQ1, ambos requisitos fundamentales para la tolerancia y acumulación de arsénico.

Por otro lado, se utilizaron plantas de tabaco modificadas genéticamente disminuyendo los niveles de ck, para comprobar estas observaciones en otras especies de plantas con las mismas modificaciones. Los resultados mostraron que las ck actúan como un regulador negativo en respuesta al As (V) estimulando la maquinaria de desintoxicación, conduciendo a la acumulación de As (III) en vacuolas tras la formación de complejos con las PCs. A pesar de estos resultados son necesarios nuevos estudios

para determinar cómo las plantas activan la cantidad de biotioles desencadenados por la disminución de citoquininas.

**Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*
(Nature Communications, 2014)**

ARTICLE

Received 15 Jan 2014 | Accepted 8 Jul 2014 | Published 7 Aug 2014

DOI: 10.1038/ncomms5617

Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*

Eduardo Sánchez-Bermejo^{1,*†}, Gabriel Castrillo^{1,*}, Bárbara del Llano¹, Cristina Navarro¹, Sonia Zarco-Fernández², Dannys Jorge Martínez-Herrera³, Yolanda Leo-del Puerto¹, Riansares Muñoz², Carmen Cámara², Javier Paz-Ares¹, Carlos Alonso-Blanco¹ & Antonio Leyva¹

The enormous amount of environmental arsenic was a major factor in determining the biochemistry of incipient life forms early in the Earth's history. The most abundant chemical form in the reducing atmosphere was arsenite, which forced organisms to evolve strategies to manage this chemical species. Following the great oxygenation event, arsenite oxidized to arsenate and the action of arsenate reductases became a central survival requirement. The identity of a biologically relevant arsenate reductase in plants nonetheless continues to be debated. Here we identify a quantitative trait locus that encodes a novel arsenate reductase critical for arsenic tolerance in plants. Functional analyses indicate that several non-additive polymorphisms affect protein structure and account for the natural variation in arsenate reductase activity in *Arabidopsis thaliana* accessions. This study shows that arsenate reductases are an essential component for natural plant variation in As(V) tolerance.

¹Department of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. ²Department of Analytical Chemistry, School of Chemical Sciences, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. ³Department of Macromolecular Structures, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. * These authors contributed equally to this work. † Present address: School of Biological Science, Faculty of Science, Monash University, Clayton Campus, Clayton, Melbourne, Victoria 3800, Australia. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.L. (email: aleyva@cnb.csic.es).

Groundwater contamination with arsenic is a threat for most organisms, including man^{1–3}. In plants, arsenic tolerance is critical for adaptation to specific soils and has determined plant distribution^{4,5}; the molecular mechanisms are analyzed mainly by studying proteins presumably involved in arsenate (As(V)) tolerance based on sequence homology with bacterial and yeast proteins^{6,7}. Genetic approaches are little used to study As(V) tolerance mechanisms^{8–12}, and the genes implicated in natural intraspecific variation are unknown^{13–15}.

Here we address the natural genetic variation of *Arabidopsis thaliana* for arsenate tolerance, leading to the identification of a major effect quantitative trait locus (QTL) *ATQ1*. Molecular isolation and characterization of this locus showed that it encodes a novel plant arsenate reductase whose contribution to the natural variation for arsenate tolerance is caused by several functional polymorphisms.

Results

Natural variation identifies a QTL for arsenate tolerance. We evaluated variation in As(V) tolerance in a collection of 82 *A. thaliana* accessions with a broad geographic distribution (Supplementary Data 1). Using a root growth recovery (RGR) assay, we quantified the percentage of plants that recovered root growth in As(V)-free medium after brief As(V) exposure (Supplementary Fig. 1a). We found substantial genetic variation among accessions, which defines two phenotypic groups for As(V) tolerance (Fig. 1a). The first, with a clear As(V)-sensitive phenotype, is represented by genotype Kashmir-1 (Kas-1; 7% RGR), and the other is comprised of accessions with As(V) tolerance similar to that of Col *gl-1* (Col) in which 77% of plants recovered root growth after As(V) exposure (Fig. 1a,b). As(V) tolerance can be associated with slow As(V) uptake^{11,16,17} and correlates with enhanced arsenic accumulation^{8,11}. We observed that Col accumulated three times more arsenic than Kas-1 (Supplementary Fig. 1b); nonetheless, both accessions show similar As(V) uptake (Supplementary Fig. 1c), suggesting that other mechanisms may be responsible for this strong phenotypic variation.

To determine the genetic basis of natural variation for As(V) tolerance in *A. thaliana*, we used QTL mapping for the RGR trait in a Col x Kas-1 recombinant inbred line (RIL) population¹⁸. We found a large effect locus that accounts for 55% of the phenotypic variance on chromosome 2 (Fig. 1c, Supplementary Data 2), which we termed arsenate tolerance *QTL1* (*ATQ1*). The *ATQ1* effect was confirmed in near-isogenic lines (NIL) derived from a specific *ATQ1*-Kas-1 RIL (Supplementary Fig. 1d). NIL bearing *ATQ1*-Kas-1 alleles introgressed in the Col background showed a percentage of RGR similar to that of Kas-1 parental plants (Supplementary Fig. 1d), and F₁ plants derived from the NIL128 x Col cross behaved similarly to Col parents; these data indicate that the As(V)-sensitive allele *ATQ1*-Kas-1 is recessive (Fig. 1d). QTL mapping for As(V) tolerance in a RIL population derived from As(V)-sensitive Tsu-0 and the Col-0 reference strain also detected a major effect QTL in the same genetic position (Supplementary Fig. 2, Supplementary Data 3). The similar effect and location of the Tsu-0 x Col-0 QTL and *ATQ1* suggested that this is the main locus responsible for natural *A. thaliana* variation in As(V) tolerance.

***ATQ1* encodes a rhodanase-like protein.** *ATQ1* was fine-mapped using an F₂ population of 679 plants derived from the NIL128 x Col cross (Supplementary Fig. 3). Phenotypic characterization of selected F₃/F₄ homozygous recombinants located *ATQ1* in a 0.7-Mb genomic region between positions 8.9 and 9.6 Mb (Supplementary Fig. 3). Further analysis of this region for

ATQ1 candidate genes identified At2g21045 as a gene encoding a protein with 46% identity and 62% similarity with the At5g66040 sulphur transferase of the rhodanase family¹⁹ (Fig. 1e). The presence of a rhodanase domain is characteristic of eukaryotic As(V) reductases^{19–21}, an activity which might be responsible for arsenate tolerance. To test whether At2g21045 is responsible for *ATQ1*, we characterized a transfer DNA (T-DNA) insertion mutant of this gene in the Col-0 background, As(V) sensitivity was similar to that of Kas-1 plants (Fig. 1f). In phenotypic analyses of F₁ plants derived from a cross between the At2g21045 T-DNA mutant and Kas-1, the *ATQ1*-Kas-1 allele did not complement the mutant phenotype for the RGR trait (Fig. 1f). The As(V)-tolerant phenotype of transgenic plants that overexpressed At2g21045-Col gene in a NIL128 background resembled that of the parental Col accession (Fig. 1g). These results indicated that the At2g21045 gene is *ATQ1*, whose Col and Kas-1 alleles account for natural variation in As(V) tolerance.

***ATQ1* reveals a new arsenate reductase.** To identify the underlying molecular mechanism, we tested whether *ATQ1*/At2g21045 encoded an As(V) reductase. Structural modelling analyses of *ATQ1*/AT2G21045 protein suggested that it retains the overall rhodanase fold characteristic of As(V) reductases (Supplementary Fig. 4a,b). Col plants exposed to trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS, a rhodanase inhibitor) showed an As(V)-sensitive phenotype. Although TNBS has an effect on thiol content²², this observation suggests that a rhodanase-like protein might be responsible for As(V) tolerance in Col accession (Supplementary Fig. 4c). The *ATQ1*/AT2G21045 sequence has a cysteine residue (Cys¹¹³ in Col-0; Fig. 1e) in a C(X)₄R motif similar to C(X)₃R or HC(X)₅R, characteristic of the As(V) reductase catalytic active site^{21,23}. Increased sensitivity to As(V) but not to As(III) is a characteristic of As(V) reductase mutants²⁴. Analyses of As(V) and As(III) tolerance showed that Kas-1, NIL128 and the *ATQ1*/At2g21045 T-DNA mutant were highly sensitive to As(V) but not to As(III) compared with Col-0 plants, further supporting that *ATQ1* encodes an arsenate reductase (Fig. 2a,b).

In *A. thaliana* it has been previously described that another rhodanase protein, AtACR2, homologous to the yeast arsenate reductase, is able to complement the *E. coli* arsenate reductase mutant suggesting that AtACR2 encodes an As(V) reductase (Fig. 1e). In contrast, using our RGR system we found no differences in As(V) sensitivity in *Atacr2* T-DNA knockout or *ACR2*-overexpressing lines compared with Col-0 (Fig. 2c). Although the biological significance of AtACR2 was questioned in a study²⁵, *Atacr2* knockout line showed no arsenate reductase activity²⁶ but displayed a remarkable As(V)-sensitive phenotype^{25,27}. Therefore we cannot exclude the possibility that under certain conditions AtACR2 has a relevant role in As(V) tolerance as an As(V) reductase. Phylogenetic analysis shows that *ATQ1*/AT2G21045 is remarkably different from the ACR2 rhodanase clade (Supplementary Fig. 5). In fact, the large diversity of the widespread protein rhodanase family does not allow the identification of a conserved AT2G21045 ortholog in most plant species further than *A. thaliana* closest relatives. We thus concluded that At2g21045 encodes a new rhodanase protein responsible for the natural genetic variability for arsenate tolerance in *A. thaliana*.

To determine whether At2g21045 encodes a *bona fide* As(V) reductase, we used functional complementation analyses of the *E. coli* mutant Δ *arsC* (in WC3110 strain). This strain lacks the bacterial As(V) reductase gene and has an intact As(III) extrusion pump; it thus has increased sensitivity to As(V) but not to As(III)²⁸. Our analyses showed that At2g21045-Col-0 expression

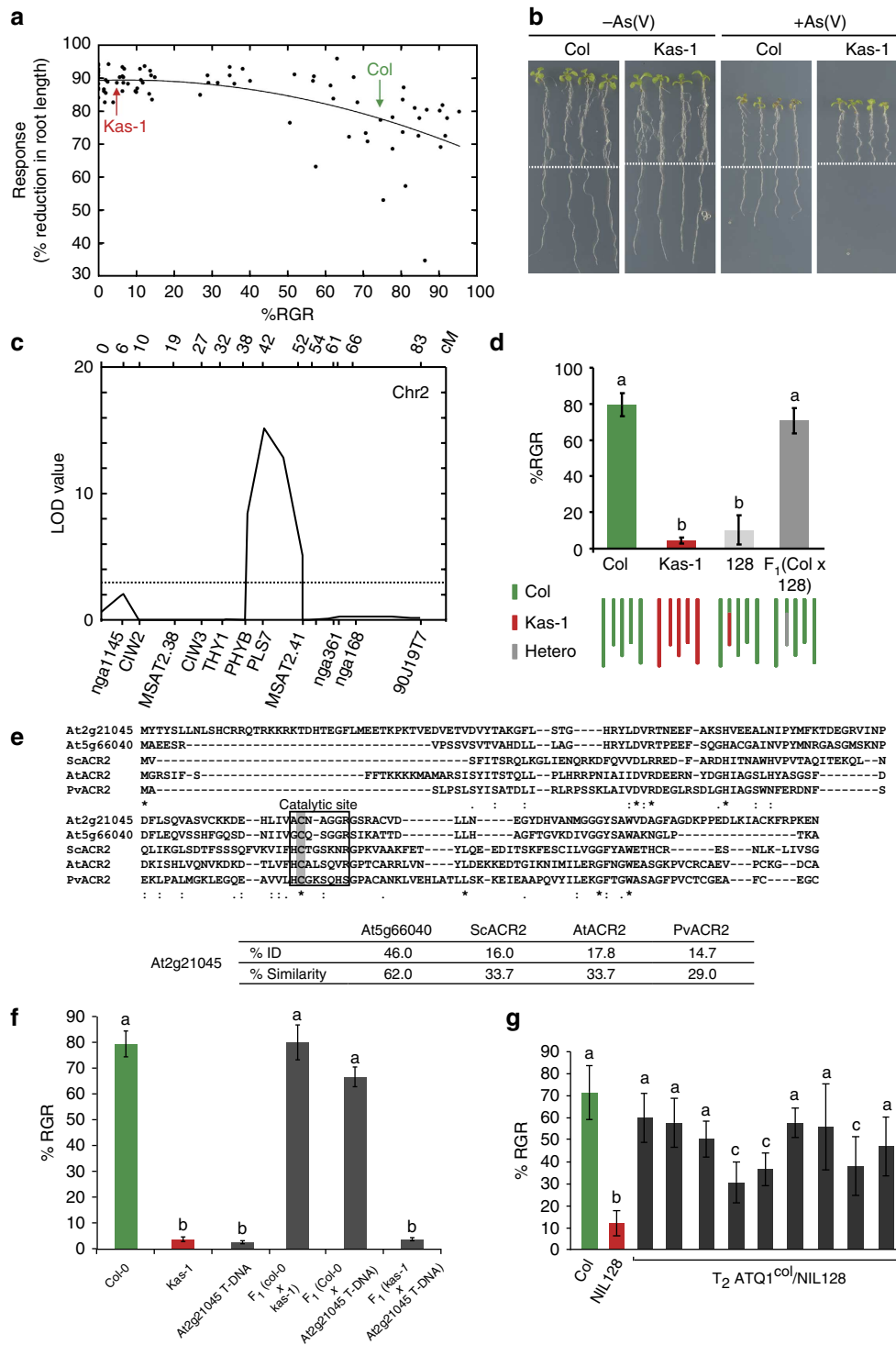


Figure 1 | Identification of ATQ1 for As(V) tolerance. (a) Quantification of As(V) tolerance phenotype in 82 *Arabidopsis* accessions. The percentage of root growth reduction in response to 15 μM As(V) is plotted against the percentage of plants that recover root growth after 24 h exposure to 15 μM As(V) (%RGR; see Methods). Col *gl-1* (Col; green) and Kashmir (Kas-1; red) are indicated. (b) As(V) tolerance phenotype of Col *gl-1* (Col) and Kashmir (Kas-1) plants using the RGR assay. Dotted line indicates starting point of root growth in +Pi medium. (c) LOD score values from multiple QTL mapping analysis. ATQ1 mapping is shown between markers PHYB and MSAT2.41. (d) Confirmation of ATQ1. NIL128 and Col x NIL128 F₁ plants were used for %RGR determination. Graphical genotypes are shown beneath the graph. Bars show mean ± s.d. (n = 3). (e) Alignment of Col-O AT2G21045 protein with the *Arabidopsis thaliana* sulfurtransferase (AT5G66040) and with arsenate reductases from *Saccharomyces cerevisiae* ScACR2 (NP_015526), *Arabidopsis thaliana* AtACR2 (AT5G03455) and *Pteris vittata* PvACR2 (ADP20951). The catalytic site with the active cysteine residue (grey background) is shown (box). “*” (asterisk) indicates positions with a single, fully conserved residue, “:” (colon) and a “.” (period) indicate conservation of amino acids with strong and weak similarity in properties, respectively. The table shows percentages of amino acid sequence identity (%ID) and similarity between AT2G21045 and other proteins in the alignment. (f,g) Quantitative complementation test for ATQ1. (f) Col-O, Kas-1, At2g21045 T-DNA, the F₁ from crosses of Col-O or Kas-1 with At2g21045 T-DNA plants and (g) Col *gl-1* (Col), NIL128 and the T₂ of nine independent At2g21045-overexpressing lines (T₂ ATQ1^{Col}/NIL128) were used for %RGR determination. Bars show mean ± s.d. (n = 3). Means with different letters are significantly different (t-test, P < 0.05).

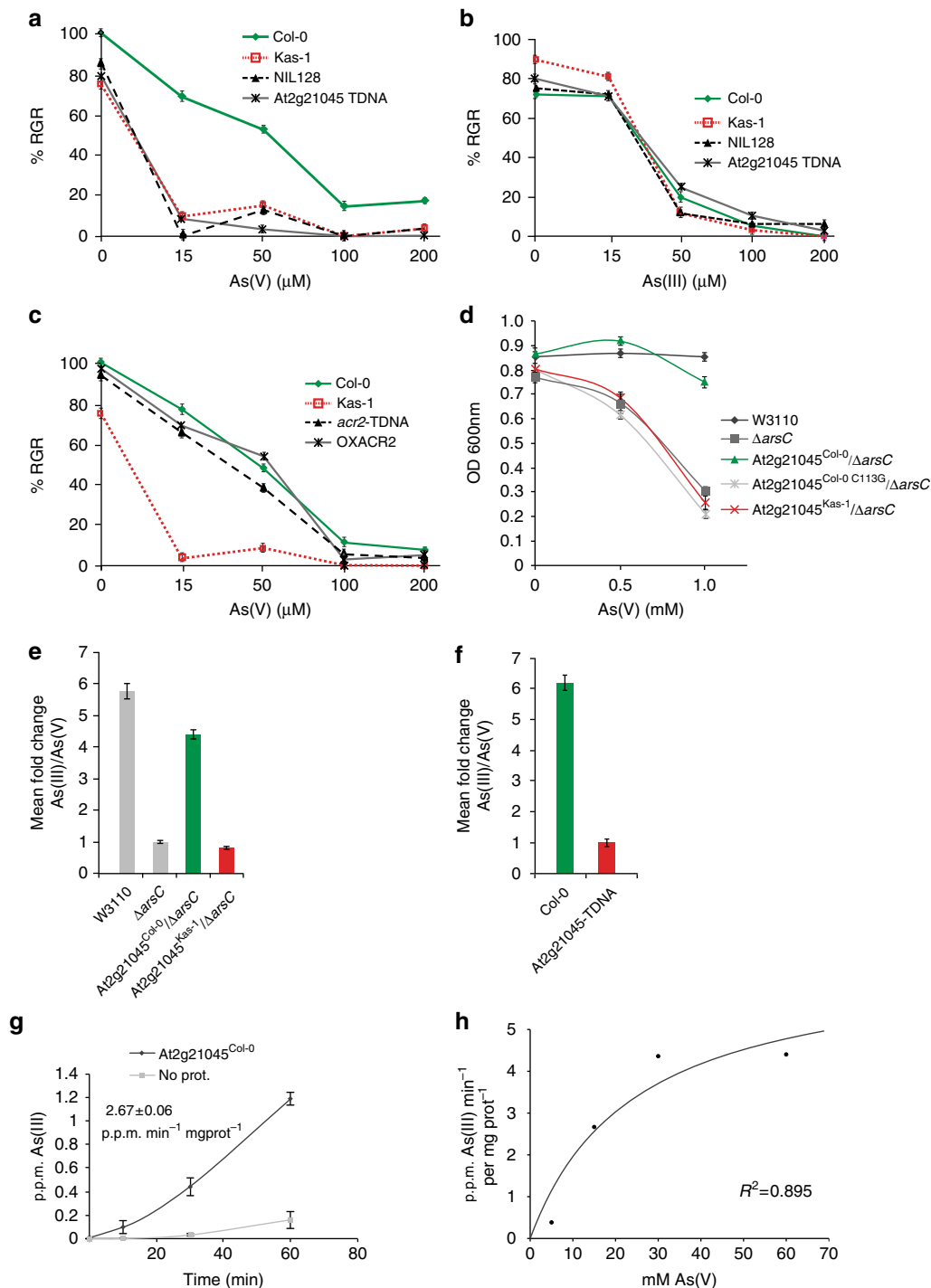


Figure 2 | Arabidopsis At2g21045 gene encodes an arsenate reductase. (a) As(V) and (b) As(III) tolerance analysis of Col-0, Kas-1, NIL128 and the *At2g21045* T-DNA mutant. Percentage of RGR (%RGR) was determined at various As(V) and As(III) concentrations. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (c) *Atacr2* T-DNA mutant (*acr2*-T-DNA) and ACR2-overexpressing lines (OXACR2) have an As(V) tolerance phenotype similar to that of Col-0. %RGR was determined at various As(V) concentrations. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (d) Complementation analysis of *E. coli* $\Delta arsC$ strain. Wild-type strain W3110, W3110 with an *arsC* gene deletion ($\Delta arsC$), $\Delta arsC$ expressing the *At2g21045*-Col-0 allele (*At2g21045^{Col-0}/ΔarsC*) or expressing this allele with replacement of the active Cys₁₁₃ by Gly₁₁₃ (*At2g21045^{ColC113G}/ΔarsC*) or expressing the *At2g21045* Kas-1 allele (*At2g21045^{Kas-1}/ΔarsC*) were grown in various As(V) concentrations. Values are mean \pm s.d. ($n = 3$). (e) Arsenic species analysis in culture supernatants of *E. coli* wild type (W3110), $\Delta arsC$, $\Delta arsC$ expressing the *At2g21045*-Col-0 allele (*At2g21045^{Col-0}/ΔarsC*) or $\Delta arsC$ expressing the *At2g21045* Kas-1 allele (*At2g21045^{Kas-1}/ΔarsC*) exposed to As(V) 24 h. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (f) Arsenic species analysis of extracts of Col-0 and *At2g21045* T-DNA mutant plants exposed to 5 μ M As(V); 24 h. Values are mean \pm s.d. ($n = 5$). (g,h) *In vitro* AT2G21045 arsenate reductase activity. (g) Arsenate reductase activity measured as As(III) production of a recombinant AT2G21045 protein in the presence of 15 mM As(V). Same analysis was conducted in the absence of protein (No Prot). Graph represents parts per million (p.p.m.) of As (III). The value of the specific enzymatic activity is given. Data shows mean \pm s.d. ($n = 3$). (h) Arsenate reductase activity of recombinant AT2G21045 protein with increasing As(V) concentrations. A K_m value of 25 was estimated using SigmaPlot v.12.5 for non-linear regression analysis. The coefficient of determination (R^2) used to fit the data to a curve is given.

restored $\Delta arsC$ growth in the presence of As(V), whereas expression of an At2g21045-Col-0 mutant form with a Cys¹¹³-to-Gly¹¹³ substitution was unable to complement the $\Delta arsC$ phenotype (Fig. 2d). In the presence of As(V), the $\Delta arsC$ strain expressing At2g21045-Col-0 showed increased As(III) extrusion, similar to the WC3110 wild-type strain (Fig. 2e and Supplementary Fig. 6a). Moreover, plant As(V) content as well as As(III)/As(V) ratio were significantly higher in Col plants than in the At2g21045 T-DNA mutant (Fig. 2f and Supplementary Fig. 6b). Furthermore, ATQ1 purified protein expressed in *E. coli* exhibited arsenate reductase activity *in vitro* (Fig. 2g) and kinetic parameter (K_m) for As(V) was in the range of other eukaryotic arsenate reductases previously identified^{12,28} (Fig. 2h). We thus concluded that At2g21045 encodes an As(V) reductase, which we termed *Arabidopsis thaliana* arsenate reductase QTL1 (AtARQ1).

AtARQ1 natural alleles define two frequent haplogroups. To test the functional basis of AtARQ1/At2g21045 natural variation,

we analyzed the nucleotide diversity of its coding region in Col-0, Kas-1 and a set of 18 accessions distributed worldwide (Supplementary Fig. 7a). We found five missense mutations and two compensatory indels of one and five nucleotides differing between Col-0 and Kas-1, which alter the amino acids in positions 2–19 (Fig. 3a). A functional effect of this structural variation in this reductase was supported by the folding disruption predicted by AtARQ1-Kas-1 protein modelling (Fig. 3b). Col-0 and Kas-1 define two major haplotypes, as detected by cluster analysis, differentiated by the seven structural polymorphisms described above, as well as 23 silent (synonymous and intronic) mutations (Supplementary Fig. 7b). Haplotype network analysis of 827 AtARQ1 sequences from the 1001 Arabidopsis Genome Project (<http://www.1001genomes.org>) showed that Col-0 and Kas-1 haplogroups differ from the *A. lyrata* branch by one and three of the missense mutations, respectively (Fig. 3c). The Col-0 As(V)-tolerant haplogroup thus appeared to be closer to the ancestral allele. Both haplogroups are distributed worldwide, although Kas-1 haplogroup is found at high frequency in Asia

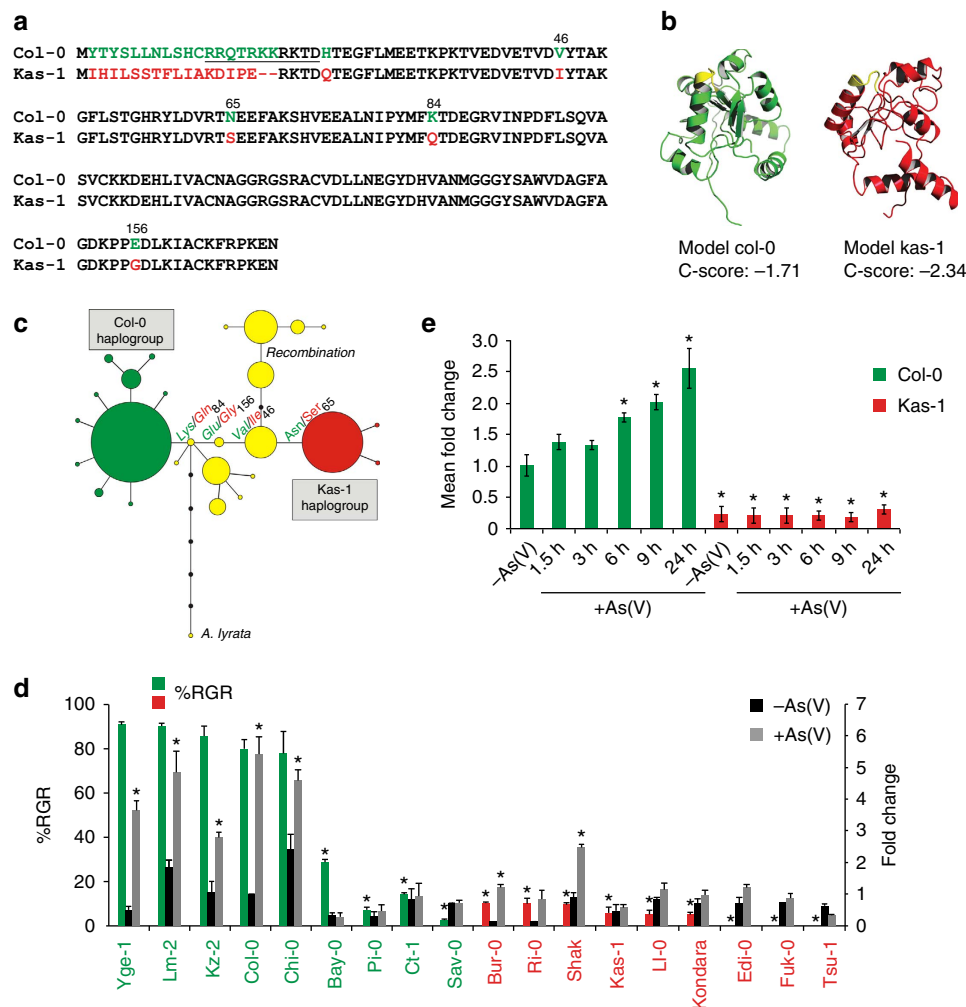


Figure 3 | Allelic variation at AtARQ1 involves structural and regulatory polymorphisms. (a) Alignment of AtARQ1 proteins from Col-0 and Kas-1. Changes in amino acid sequence between Col-0 (green) and Kas-1 (red). Numbers indicate positions of changes. Nuclei localization signal is underlined. (b) Three-dimensional structural models of AtARQ1 proteins from Col-0 and Kas-1 predicted by I-TASSER. Predicted confidence (C-score) rankings are shown. ¹¹³CX₄R¹¹⁸ motifs are in yellow. (c) Haplotype network analysis using AtARQ1 proteins from the 1001 Arabidopsis Genome Project and *Arabidopsis lyrata*. Each line segment corresponds to an amino acid substitution. Areas of circles are proportional to frequency and colors depict the two major haplogroups. (d) Northern blot quantification of AtARQ1 expression and %RGR in several Arabidopsis accessions. Plants were grown alone or exposed to 30 μ M As(V) 24 h. Bars show mean \pm s.d. ($n = 2$). %RGR was determined in 18 Arabidopsis accessions representing Col-0 (green) and Kas-1 (red) haplogroups. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (e) Quantitative reverse transcription-PCR time-course analysis of AtARQ1 expression in response to As(V). Col-0 (green) and Kas-1 (red) plants were exposed to 30 μ M As(V) for the indicated time. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). * $P < 0.05$ Student's t -test.

(Supplementary Fig. 7c). This geographical pattern appears to be determined at least in part by *A. thaliana* demographic history, as Kas-1 haplogroup distribution overlaps markedly with the Asian-dominant genetic group detected by genome-wide neutral single-nucleotide polymorphism²⁹.

The contribution of AtARQ1 amino acid substitutions to As(V) tolerance variation was evaluated by further analyzing the 18 sequenced accessions. All accessions with the Kas-1 haplotype had an As(V)-sensitive phenotype (RGR < 30%), indicating that the Col-0 haplotype is needed for As(V) tolerance (Fig. 3d, Supplementary Data 1). AtARQ1-GFP fusion protein localized in cytoplasm and also in nuclei (Supplementary Fig. 8a). AtARQ1 nuclei localization mirrors the localization pattern of cell cycle CDC25 phosphatases³⁰ that are homologous to arsenate reductases. Accordingly, a predicted nuclear localization signal is present at the N-terminal region of AtARQ1 (Fig. 3a). Gene expression analysis showed that As(V) induces *AtARQ1* in Col-0 mainly in roots (Supplementary Fig. 8b). In contrast Kas-1 has much lower gene expression (Fig. 3e). Expression analyses of the 18 accessions confirmed that both haplogroups also differ in *AtARQ1* regulation, since Col-0 haplotype accessions showed higher *AtARQ1* expression on average than Kas-1 genotypes (Fig. 3d). Four Col-0 haplotype accessions nonetheless showed low *AtARQ1* expression (Bay-0, Pi-0, Ct-1, Sav-0) and all had an As(V)-sensitive phenotype. These data indicate that both structural and regulatory (cis and/or trans) allelic variations affect *AtARQ1* function and thus, As(V) tolerance. One Kas-1 haplotype accession (Shak) showed high *AtARQ1* expression but an As(V)-sensitive phenotype (Fig. 3d), further supporting the idea that *AtARQ1* structural polymorphisms are a major functional cause of natural variation in As(V) tolerance.

Non-additive intra-allelic mutations explain ATQ1 function.

To demonstrate the functional effects of *AtARQ1* structural variation, we used complementation of $\Delta arsC$ mutant strains with various chimeric *AtARQ1* proteins generated by directed mutagenesis (Fig. 4a). In bacteria expressing *AtARQ1* from Col-0 or Kas-1, these proteins differed greatly in their As(V) reductase activity; Col-0 but not Kas-1 was able to restore bacterial growth and As(III) extrusion (Fig. 2d,e). We used Kas-1 sequences to replace the first 23 amino acids after the first methionine (Fig. 4a),

or single residues at positions 46, 65, 84 or 156 in five Col-0 proteins; these chimeric proteins complemented bacterial growth similar to the Col-expressing bacteria (Fig. 4b). This result suggested that several structural changes are necessary to explain functional differences between Col-0 and Kas-1 *AtARQ1*. This was demonstrated by $\Delta arsC$ complementation analysis of *AtARQ1*-Col-0 proteins with double or triple combinations of the four missense mutations that distinguish Kas-1 from Col-0 haplogroups in network analysis (Figs 3c and 4a). These analyses showed that expression of *AtARQ1* bearing any combination of the three missense mutations that differentiate Kas-1 from *A. lyrata* (positions 156, 46 and 65; Fig. 3c) does not restore $\Delta arsC$ As(V) sensitivity (Fig. 4b). Bacteria transformed with *AtARQ1* bearing Kas-1 mutations at positions 65/84 had an As(V)-resistant phenotype comparable to that of the wild-type strain (Fig. 4b), which implies that the Lys₈₄/Gln₈₄ missense mutation does not affect protein function, and suggests that *A. lyrata AtARQ1* encodes a functional As(V) reductase. At difference from most plant QTL identified so far, which are due to single functional polymorphisms³¹, natural variation at *AtARQ1* involves several structural nucleotide polymorphisms that act in a non-additive manner on As(V) reductase function. Recent studies showed the first large effect natural alleles from plants due to multiple additive functional polymorphisms^{32,33}. Our results provide evidence of the higher complexity that can underlie natural alleles and the combinatorial impact of multiple intra-allelic mutations with little or no additive effect, in the generation of large effect alleles that contribute to quantitative variation and evolution in plants³⁴. It is very unlikely that the *AtARQ1*-Kas-1 allele is null, since a fully expressed protein is predicted. Although the true functional features of *AtARQ1* variation are unknown, our findings suggest that several functional allelic polymorphisms have contributed to its maintenance in nature.

This study shows the use of natural variation to detect alleles involved in plant adaptation to environmental chemical stress. Identification of *AtARQ1* demonstrates the critical role of a new group of As(V) reductases in As(V) tolerance and detoxification in plants. This role coincides with the enhanced As(V) reductase activity observed in naturally selected As(V) hyper-accumulator plants, which triggers an increase in plant capacity to detoxify As(III)³⁵. To date, the mechanism of this enhanced activity was not known. The identification of several *AtARQ1* functional

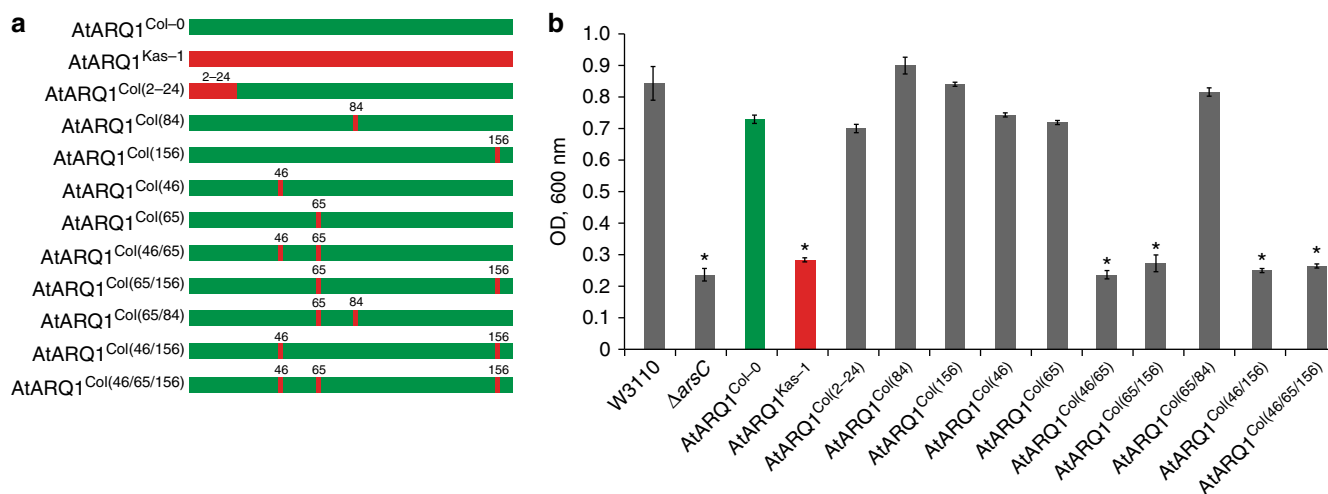


Figure 4 | Several structural non-additive polymorphisms affect *AtARQ1* function. (a) Diagram of *AtARQ1* from Col-0, Kas-1 and their chimeric proteins. Numbers indicate positions at which the Kas-1 amino acid was introduced into the Col-0 protein. (b) Complementation analysis of *E. coli* $\Delta arsC$ mutant overexpressing different chimeric *AtARQ1* proteins indicated in a. All strains were grown in 1 mM As(V). Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). * $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

polymorphisms further indicates considerable complexity in the natural variation and evolution of As(V) secondary metabolism genes with pleiotropic effect on a trait related to fitness, such as As(V) tolerance. Thus, *AtARQ1* provides an additional molecular component for understanding plant adaptation to arsenate. Furthermore, since *AtARQ1* gene contributes to *A. thaliana* natural variation for arsenate tolerance at organism level, it shows a higher potential for phytoremediation than other genes involved in arsenic metabolism whose modifications are not maintained in nature.

Methods

Plant materials and growth conditions. A collection of 82 *Arabidopsis thaliana* accessions with worldwide distribution was analyzed for As(V) tolerance (Supplementary Data 1). Two RIL populations of 93 and 150 lines derived from the crosses Col *gl-1* x Kas-1 (ref. 18) and Col-0 x Tsu-0 (ref. 36), respectively, were used for QTL mapping for As(V) tolerance as estimated by the RGR assay (Supplementary Data 2,3).

The At2g21045 T-DNA mutant (GK-868F11) that bears an insertion in the second exon was obtained from the GABI-Kat³⁷. Homozygous knockout plants were selected by PCR using the T-DNA-specific primer 5'-ATAATAACGCTGC GGACATCTACATTTT-3' and the At2g21045-specific primer 5'-AAATGTTCA TCTTCTTGCAACC-3'. The At5g03455 T-DNA mutant (GK-772G06)³⁷ with an insertion in *AtACR2* and its overexpression line were used. Both lines were kindly provided by Professor Francis Dennis, Cardiff University (Wales, UK).

Seedlings were grown on Johnson medium supplemented with Pi (KH₂PO₄) at various concentrations, depending on the experiment; 1 mM Pi was used for complete medium (+ Pi), and 5 μM for phosphate-starvation medium (- Pi). In general, for As(V) treatment (NaH₂AsO₄·7H₂O), plants were grown on Johnson medium + Pi for 7 days, transferred to - Pi medium for 2 days, and finally to liquid - Pi medium alone or supplemented with 30 μM As(V). For all molecular and biochemical analyses, *Arabidopsis* plants were grown in a culture chamber in a 16-h light/8-h dark regime (24 °C/21 °C).

QTL analyses for As(V) tolerance. For QTL mapping, the 93 or 150 RILs of the Col *gl-1* x Kas-1 or Col-0 x Tsu-0 populations, respectively, were grown and phenotyped using the RGR assay described in physiological section. All lines from each population were grown simultaneously in the same growth chamber, at 21 °C and long day photoperiod (16-h light/8-h dark regime) organized in a two complete blocks design. Each block contained 13–30 plants per RIL grown in a single vertical plate. For each RIL, the mean percentage of plants that showed %RGR was calculated from the two blocks, and means were transformed by the angular transformation (arcsin √). These data were analyzed for QTL mapping of As(V) using the genetic map with 99 and 79 markers previously developed for the Col *gl-1* x Kas-1 and Col-0 x Tsu-0 populations^{18,36}. QTL were mapped by the multiple QTL mapping method implemented in MapQTL v.4.0 software³⁸. QTL were detected using LOD thresholds of 3, corresponding to an approximate genome-wide significance $\alpha = 0.01$, as estimated with the MapQTL permutation test. The additive allele effect and the percentage of variance explained by each QTL, as well as the total variance explained by the additive effects of all QTL detected for the trait analyzed, were obtained from multiple QTL mapping method models.

Development of NIL and fine mapping of ATQ1. NIL bearing *ATQ1*-Kas-1 alleles in Col *gl-1* background were developed from the selected RIL CK-893. The genetic background of this RIL was Col *gl-1* except for the complete chromosome 2 (where *ATQ1* is located) and four genomic regions of chromosomes 1 and 5. CK-893 was backcrossed to Col *gl-1* and an F₂ population of 600 plants was analyzed for 18 indel, simple sequence length polymorphism and the morphological (*gl-1*) marker (see Supplementary Data 4) to select Kas-1 homozygous individuals for the introgression fragment around *ATQ1* and Col *gl-1* for the remaining genomic segments. From this analysis, we obtained four F₂ individuals homozygous for all but one of the regions. F₃ and F₄ plants were analyzed to obtain the four final NILs (128, 154, 155 and 248) with a single Kas-1 introgression fragment of ~12 Mb on the Col *gl-1* background. The NIL128 and 155 Kas-1 introgression fragments are located between physical positions 7 and 19.6 Mb, which overlap the NIL154 and 248 *ATQ1* introgressed region located between positions 0 and 11.1 Mb (Supplementary Fig. 1d). To characterize *ATQ1*, the NILs, parental lines and F₁ plants derived from crosses of Col *gl-1* × NIL128 were grown simultaneously as described for RIL populations.

Fine mapping of *ATQ1* was carried out using an F₂ mapping population of 679 plants derived from a cross between NIL128 and Col. These plants were genotyped with 11 indel and simple sequence length polymorphism markers around the *ATQ1* region between physical positions 7 and 11.1 Mb (Supplementary Fig. 3). *ATQ1* was genotyped in the QTL region by analyzing the As(V) tolerance phenotype of F₃ families derived from selected F₂ recombinant plants. To confirm and validate the fine mapping results from F₃ families, we obtained a set of 16 F₄

homozygous NIL with partially overlapping introgression fragments from selected recombinants³⁹. Sister plants (16–20) from selected F₃ families were genotyped around the *ATQ1* region, and homozygous recombinant individuals were selected and selfed. One of the F₄ offspring from the selected F₃ individual was again genotyped with markers flanking the recombination point to confirm the genotype of the final homozygous recombinant NIL.

Physiological measurements. For As(V) tolerance analysis, plants were grown on Johnson medium in Pi starvation conditions (- Pi) for 7 days and transferred to 15 μM As(V) alone or with 1 mM TNBS for 1 day; plants were then grown in 1 mM Pi (+ Pi) plates in a vertical position for 1 day. The percentage of plants that showed %RGR was then determined. Alternatively, plants were grown on Johnson Pi medium alone or with various As(V) concentrations (7 days). Main root length was measured using ImageJ v.1.48c (ref. 40). For arsenic accumulation experiments, plants were grown on plates with half-strength Bates and Lynch medium solidified with 0.4% bacto-agar with 30 μM Pi, covered with 0.4-mm pore nylon mesh. Seeds were sown onto the mesh and cultured for 7 days. Plants were treated with Pi and PII buffers⁴¹. Arsenic accumulation and uptake experiments were performed in 50 ml pots using 5 μM As(V), for 24 h and 1 h, respectively. Plants were dried (60 °C, 5 days), mineralized with HNO₃-H₂O₂ in a pressure digester, and analyzed for total arsenic content by inductively coupled plasma-mass spectrometry.

Complementation of bacteria. *Escherichia coli* strains W3110 (wild type; K12 F2 IN (rrnD-rrnE))⁴² and WC3110 (Δ arsC) (Δ arsC; W3110 Δ arsC::Kan)²⁸ alone or transformed with the *AtARQ1* constructs encoding different versions of the protein were used for As(V) sensitivity assays. Three replicates of the Δ arsC strain bearing *AtARQ1* variants were grown in liquid LB medium with shaking (37 °C, overnight). The OD_{600 nm} was measured, cultures were diluted with low Pi medium³⁹ to OD_{600 nm} = 0.2, and allowed to grow alone or in various As(V) concentrations (30 °C, 24 h). Bacterial growth in different As(V) concentrations was determined at OD_{600 nm}.

Expression and purification of ATARQ1. A culture of *E. coli* BL21 cells, harbouring the plasmid pDEST17-*AtARQ1*, was grown in LB medium containing 100 μg ml⁻¹ of ampicillin at 37 °C until the OD_{600 nm} was 0.6. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside was then added to a final concentration of 0.4 mM and growth continued for 3.5 h at 30 °C. Cells were then harvested by centrifugation, frozen in liquid nitrogen and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8), 300 mM NaCl (lysis buffer) supplemented with 10 mM imidazole and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After sonication and centrifugation, the supernatant was applied to a Ni-NTA agarose resin (QIAGEN), previously equilibrated with the same buffer, and incubated for 2 h at 4 °C in a rotatory wheel. Subsequently the resin was packed into a column, washed with 10 column volumes of lysis buffer with 10 mM imidazole, and twice with the same buffer containing 20 mM of imidazole. Protein was eluted with increasing concentration of imidazole (from 100 to 500 mM) in lysis buffer. The His-tagged recombinant protein eluted at an imidazole concentration of 100 mM. Protein concentration was estimated in a 12% polyacrylamide gel by comparison with a bovine serum albumin standard.

Determination of As(V)-reductase activity. The assay reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 7 μg of recombinant His-*AtARQ1* protein in the presence of the indicated As(V) concentration. The final reaction volume was 200 μl. Reaction was started by the addition of 0.5 mM dithiothreitol and was allowed to proceed for the indicated times at 37 °C. Reaction was stopped by the addition of 20 mM mersalyl, to displace thiol-bound As(III), and 15 s later, proteins were precipitated by the addition of 3 volumes of ice-cold methanol and kept at -80 °C until they were analyzed for As(III) quantification. The reactions were centrifuged (5500g, 10 min) and supernatant was passed through a 22-μm nylon syringe before arsenic speciation using HPLC-ICP-MS as described below. In parallel, reactions containing the complete assay mix without enzyme were performed to quantify non-enzymatic reduction of arsenate. Kinetic parameters were estimated measuring the time course of As(III) production using 6 μg of recombinant His-*AtARQ1* with increasing concentrations of arsenate in the assay mix. Non-enzymatic reduction of As(V) was subtracted and data was analyzed using SigmaPlot v.12.5.

Arsenic species analysis. Arsenic species analyses were performed using plants, bacteria and purified recombinant *AtARQ1* protein. Plants were grown and treated as for arsenic accumulation experiments (see above, physiological measurements section), and exposed to 5 μM As(V) in 50 ml pots during 24 h. Plants were dried (60 °C, 5 days) and 20 mg were used as samples for arsenic species quantification.

For bacteria, different *E. coli* strains were grown in liquid LB medium with shaking (37 °C, overnight). OD_{600 nm} was measured, all cultures were diluted with low Pi medium⁴³ to OD_{600 nm} = 0.2 and allowed to grow, alone or with 1 mM As(V) (30 °C, 24 h). Since most As(III) is extruded in bacteria, cultures were centrifuged and 1 ml of supernatant was collected. Lyophilized supernatant (20 mg) was used as cell-free extract for arsenic species quantification.

Arsenic species from plant and bacterial samples were extracted with (1:1) methanol:water using an ultrasonic homogenizer SONOPLUS HD 2200 (30%, 60 s). Extracts were centrifuged (5500g, 10 min) and supernatant was passed through a 22- μ m nylon syringe before injection in the HPLC for arsenic speciation. Diluted samples were injected onto an anion-exchange column PRP-X100 (250 mm \times 4.1 mm, particle size 10 μ m; Hamilton, Reno, NV, USA). Arsenic species were eluted in 10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, 2% (v/v) MeOH mobile phase, at a 1.5 ml min^{-1} flow rate. To test the efficiency of the applied method, three replicates of the extracts were individually digested with $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ to compare the total arsenic content (ICP-MS) with the concentration sum of all arsenic species (LC-ICP-MS) in the initial extracts. As(III) was quantified on an As(III) calibration curve; As(V) in the sample was used as an internal normalization standard.

Analytical quality control used for total arsenic content and arsenic species was validated by analyzing several Certified Reference Material (reference number SRM 1568a; NIST, USA and CRM-627; BCR, Belgium). Good agreement was found for both reference materials tested (< 10% uncertainty considering 95% confidence level). Extraction recovery was performed by spiking the samples with known amounts of different arsenic species obtaining recoveries between 80–100%.

Binary construct and plant transformation. To generate At2g21045-over-expressing lines, the full-size coding region of the Col-0 At2g21045 gene was amplified with primers At2g21045Fp/At2g21045Rp (Supplementary Data 5), cloned into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen), and inserted into the pGWB2 (ref. 44) binary vector containing the constitutive 35S promoter, using the LR recombination reaction (Invitrogen). This binary construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 and transformed in NIL128 plants using the floral dip transformation method⁴⁵. Transformants were selected on 40 mg l^{-1} hygromycin-containing medium.

Bacterial constructs. For bacterial complementation, full-size At2g21045 complementary DNA (cDNA) from Col-0 and Kas-1 were amplified with primers At2g21045F/At2g21045R and At2g21045kF/At2g21045R, respectively (Supplementary Data 5). The products were excised with BamHI and HindIII and cloned into the pET-23a vector (Novagen) bearing the T7 promoter.

Using At2g21045 cDNA (Col-0) as template, we generated 10 versions of At2g21045 cDNA by PCR site-directed mutagenesis to introduce Kas-1 single-nucleotide polymorphism (primers listed in Supplementary Data 5). All protein versions were cloned into the pET-23a vector (Novagen) in the BamHI and HindIII sites. All constructs were transformed in the *E. coli* strain WC3110 (Δ arsC) (*AarsC*; W3110 Δ arsC::Kan)²⁸.

Subcellular localization. Full length AtARQ1 cDNA was cloned into pGWB5 plasmid⁴⁴, to obtain AtARQ1-GFP fusion protein. *N. benthamiana* leaves were transiently transformed by agroinfiltration with this construct and with the P19 suppressor of silencing (1:1) as described⁴⁶. Subcellular localization was observed in epidermal cells 72 h post agroinfiltration, using a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning confocal imaging system with LaserSharp2000 version 5.2 imaging software. Green fluorescent protein fluorescence was excited at 488 nm using an argon ion laser and subsequently passed through a 515/30-nm emission filter excluding chlorophyll autofluorescence.

Expression analyses. RNA was extracted with RNAwiz reagent (Ambion). For Northern blot, 15 μ g total RNA was loaded in each lane. For RNA electrophoresis, transfer to nylon membranes and hybridization was done using standard procedures⁴⁷. The probe was amplified by PCR using primers At2g21045kF-46/At2g21045Rp (Supplementary Data 5) and labelled with T4 polynucleotide kinase (Roche) and 50 μ Ci γ -³²P-ATP. Films were scanned and blot signal intensity quantified with ImageJ v.1.48c (ref. 40). To analyze AtARQ1 expression, we divided normalized AtARQ1 intensity in each accession by that in Col-0.

Quantitative reverse transcription-PCR was performed on three independent biological samples as described⁴⁸. Each sample was normalized using EF1 α (for primer pairs, see Supplementary Data 5).

Sequence analyses. A 1.3-kb genomic fragment of AtARQ1 (from ATG to 3'UTR) was sequenced in Kas-1 and 18 accessions using an ABI PRISM 3700 DNA analyzer. DNA and protein sequences were aligned with Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>) and alignments were inspected and edited by hand. The percentages of amino acid sequence identity (%ID) and similarity between AT2G21045 and the other proteins in the alignment was calculated using CLUSTALW.

A haplotype network of AtARQ1 was constructed from protein sequences of 827 accessions from the Arabidopsis 1001 Genomes Project (<http://www.1001genomes.org>) using NETWORK v.4.5 (<http://www.fluxus-engineering.com>) with the median-joining method. The first 24 amino acids of AtARQ1 were not included in these analyses, as they contain the two compensatory indel and have a higher sequencing error rate²⁹.

Molecular modelling. The three-dimensional structure of AT2G21045 was modelled using I-TASSER⁴⁹ (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Models were built mainly on the NMR solution structure of *A. thaliana* protein AT5G66040 (PDB ID 1TQ1, chain A), ranked as the best template by 6 of the 10 threading programs in I-TASSER. At5g66040 was determined to have the most similar structure to AT2G21045 by TM-ALIGN⁵⁰. All models were inspected visually and images were rendered using Pymol v1.4.1. A scoring function (C-score) based on the relative clustering structural density and consensus significance score of multiple threading templates was introduced to estimate the accuracy of I-TASSER predictions.

References

- Agusa, T. *et al.* Human exposure to arsenic from drinking water in Vietnam. *Sci. Total Environ.* **488–489**, 562–569 (2013).
- Rodríguez-Lado, L. *et al.* Groundwater arsenic contamination throughout China. *Science* **341**, 866–868 (2013).
- Williams, P. N., Raab, A., Feldmann, J. & Meharg, A. A. Market basket survey shows elevated levels of As in South Central U.S. processed rice compared with California: consequences for human dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2178–2183 (2007).
- Austruy, A. *et al.* Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three plant species: *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* and *Vicia faba*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **90**, 28–34 (2013).
- Meharg, A. A. & Macnair, M. R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.* **43**, 519–524 (1992).
- LeBlanc, M. S., McKinney, E. C., Meagher, R. B. & Smith, A. P. Hijacking membrane transporters for arsenic phytoextraction. *J. Biotechnol.* **163**, 1–9 (2012).
- Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C. & Meagher, R. B. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of Arabidopsis silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 5413–5418 (2006).
- Castrillo, G. *et al.* WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 2944–2957 (2013).
- Song, W. Y. *et al.* Arsenic tolerance in Arabidopsis is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 21187–21192 (2010).
- Sung, D. Y., Kim, T. H., Komives, E. A., Mendoza-Cózatl, D. G. & Schroeder, J. I. ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* **59**, 802–813 (2009).
- Catarecha, P. *et al.* A mutant of the Arabidopsis phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* **19**, 1123–1133 (2007).
- Ellis, D. R. *et al.* A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiol.* **141**, 1544–1554 (2006).
- Kuramata, M. *et al.* Genetic diversity of arsenic accumulation in rice and QTL analysis of methylated arsenic in rice grains. *Rice* **6**, 3 (2013).
- Ding, D. *et al.* Identification of QTLs for arsenic accumulation in maize (*Zea mays* L.) using a RIL population. *PLoS ONE* **6**, e25646 (2011).
- Zhang, J. *et al.* Mapping quantitative trait loci associated with arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* **177**, 350–355 (2008).
- Meharg, A. A. & Macnair, M. R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.* **43**, 519–524 (1992).
- Meharg, A. A. & Macnair, M. R. The mechanism of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris* L. *New Phytol.* **119**, 291–297 (1991).
- Wilson, I. W., Schiff, C. L., Hughes, D. E. & Somerville, S. C. Quantitative trait loci analysis of powdery mildew disease resistance in the *Arabidopsis thaliana* accession Kashmir-1. *Genetics* **158**, 1301–1309 (2001).
- Bordo, D. & Bork, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* **3**, 741–746 (2002).
- Cornilescu, G., Vinarov, D. A., Tyler, E. M., Markley, J. L. & Cornilescu, C. C. Solution structure of a single-domain thiosulfate sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci.* **15**, 2836–2841 (2006).
- Mukhopadhyay, R. & Rosen, B. P. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health Perspect.* **110**, 745–748 (2002).
- Fields, R. The Measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem. J.* **124**, 581–590 (1971).
- Martin, P. *et al.* Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure* **9**, 1071–1081 (2001).
- Duan, G. L. *et al.* A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytol.* **174**, 311–321 (2007).
- Liu, W. *et al.* Knocking out ACR2 does not affect arsenic redox status in *Arabidopsis thaliana*: implications for as detoxification and accumulation in plants. *PLoS ONE* **7**, e42408 (2012).

26. Duan, G. L., Zhu, Y. G., Tong, Y. P., Cai, C. & Kneed, R. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiol.* **138**, 461–469 (2005).
27. Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C. & Meagher, R. B. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 5413–5418 (2006).
28. Mukhopadhyay, R., Shi, J. & Rosen, B. P. Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 21149–21157 (2000).
29. Cao, J. *et al.* Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nat. Genet.* **43**, 956–963 (2011).
30. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. & Russell, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172–175 (1999).
31. Alonso-Blanco, C. & Méndez-Vigo, B. Genetic architecture of naturally occurring quantitative traits in plants: an updated synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **18**, 37–43 (2014).
32. Wu, W. *et al.* Association of functional nucleotide polymorphisms at *DTH2* with the northward expansion of rice cultivation in Asia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 2775–2780 (2013).
33. Coustham, V. *et al.* Quantitative modulation of polycomb silencing underlies natural variation in vernalization. *Science* **337**, 584–587 (2012).
34. Martin, A. & Orgogozo, V. The Loci of repeated evolution: a catalog of genetic hotspots of phenotypic variation. *Evolution* **67**, 1235–1250 (2013).
35. Bleeker, P. M., Hakvoort, H. W., Bliet, M., Souer, E. & Schat, H. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J.* **45**, 917–929 (2006).
36. Simon, M. *et al.* Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics* **178**, 2253–2264 (2008).
37. Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P. & Weisshaar, B. GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1211–D1215 (2012).
38. Van Ooijen, J. W. LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity* **83**, 613–624 (1999).
39. Koumproglou, R. *et al.* STAIRS: a new genetic resource for functional genomic studies of *Arabidopsis*. *Plant J.* **31**, 355–364 (2002).
40. Barboriak, D. P., Padua, A. O., York, G. E. & Macfall, J. R. Creation of DICOM-aware applications using ImageJ. *J. Digit. Imaging* **18**, 91–99 (2005).
41. Narang, R. A., Bruene, A. & Altmann, T. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol.* **124**, 1786–1799 (2000).
42. Carlin, A., Shi, W., Dey, S. & Rosen, B. P. The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimicrobial resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 981–986 (1995).
43. Oden, K. L., Gladysheva, T. B. & Rosen, B. P. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Mol. Microbiol.* **12**, 301–306 (1994).
44. Nakagawa, T. *et al.* Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 34–41 (2007).
45. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
46. Jiménez, I., López, L., Alamillo, J. M., Valli, A. & García, J. A. Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 350–358 (2006).
47. Franco-Zorrilla, J. M., Martín, A. C., Leyva, A. & Paz-Ares, J. Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol.* **138**, 847–857 (2005).
48. Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C. & Cubas, P. *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**, 458–472 (2007).
49. Ambrish, R., Alper, K. & Yang, Z. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738 (2010).
50. Zhang, Y. & Skolnick, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on TM-score. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2302–2309 (2005).

Acknowledgements

We thank Carmen L. Torán for critical reading of the manuscript. We also thank Cristihan González and Maria Muñoz for technical assistance, Luis López-Mauri for helpful discussions and Catherine Mark for editorial assistance. This work was supported by fellowships to E.S.-B., G.C., C.N., B.d.L. from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO); to S.Z.-F. from Orque-Sudoe SOE3/P2/F591 and D.J.M.-H. from La-Caixa/CNB International PhD Programme. This work was supported by research grants BIO2010-16687, BIO2010-15022, CSD2007-00057, EUI2009-03993, BIO2011-25306, BIO2011-29085 and BIO2013-45407-P from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN).

Author contributions

E.S.-B. and G.C. performed most of the experimental work with contributions from C.N., B.d.L. and Y.L.-d.P. in protein purification, arsenate reductase activity, gene expression, subcellular localization, complementation and phenotypic analysis. C.A.-B. performed haplotype network analyses, D.J.M.-H. contributes with protein modelling studies. S.Z.-F. and R.M. performed all arsenic determination and speciation analysis under C.C. supervision. A.L., J.P.-A., C.A.-B., E.S.-B. and G.C. analyzed the data and A.L. designed experiments with contributions from E.S.-B., G.C., J.P.-A. and C.A.-B. A.L. wrote the paper with contributions from all authors.

Additional information

Accession codes: Sequence data for the *ATQ1* gene of 19 wild accessions have been deposited in GenBank/EMBL/DDBJ under the accession codes KF938555 to KF938573.

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

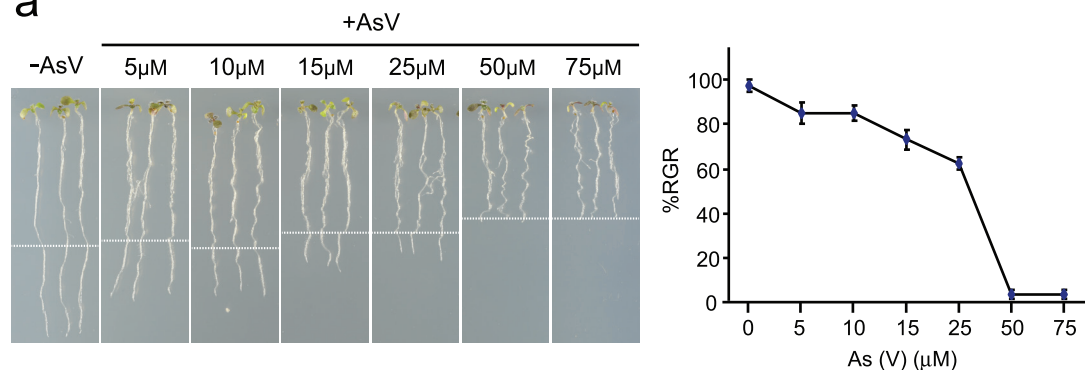
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

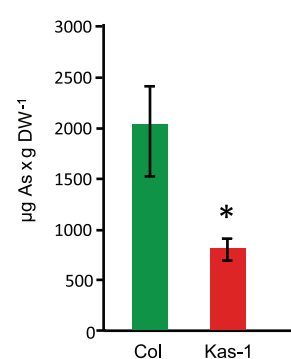
How to cite this article: Sánchez-Bermejo, E. *et al.* Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* **5**:4617 doi: 10.1038/ncomms5617 (2014).

Supplementary Figure 1

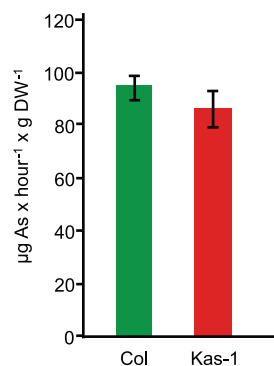
a



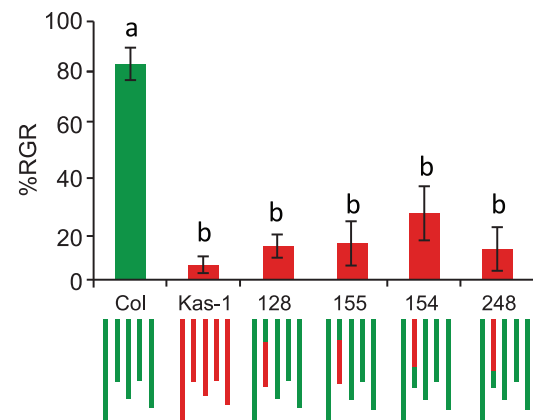
b



c

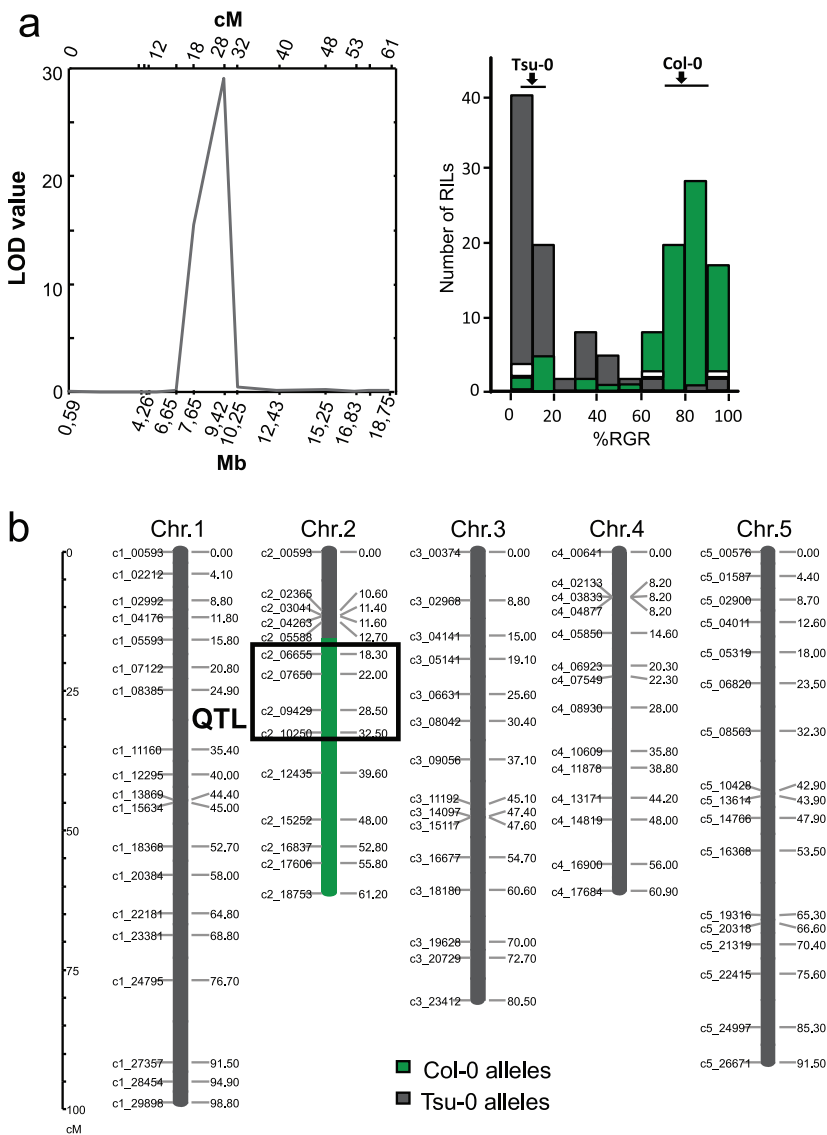


d



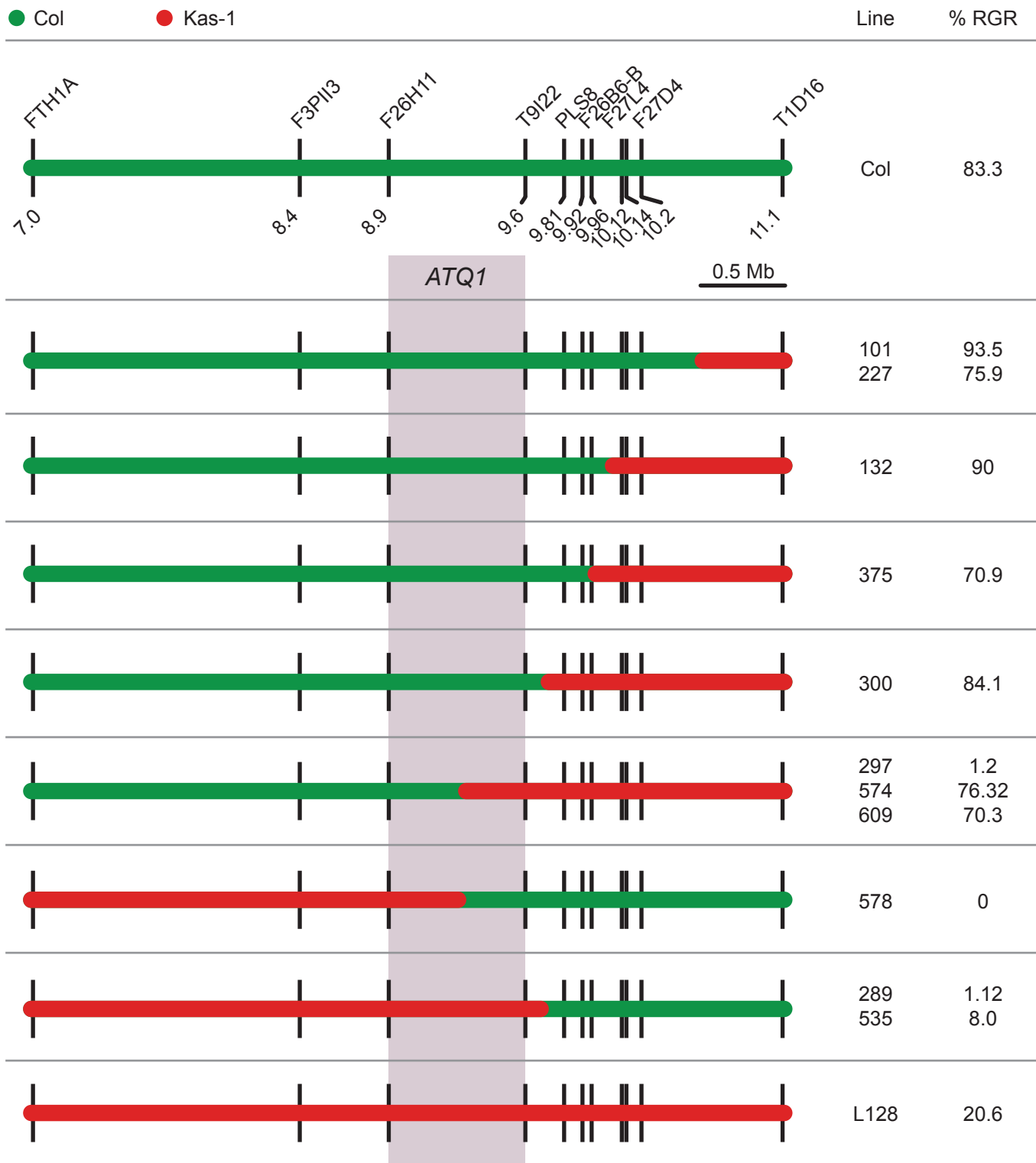
Supplementary Figure 1. As(V) tolerance phenotype in Col *gl-1* and Kas-1 accessions. (a) As(V) tolerance phenotype of Col *gl-1* (Col) plants using the %RGR assay at various As(V) concentrations. Dotted line indicates starting point of root growth in +Pi medium (left). Percentage of plants that recovered root growth (%RGR) (right). Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (b) Intracellular arsenic in Col *gl-1* (Col) and Kas-1 plants exposed to 5 μM As(V) (24 h). Bars show mean \pm s.d. ($n = 5$). (c) As(V) uptake rate in Col *gl-1* (Col) and Kas-1 plants exposed to As(V) 5 μM (1 h). Bars show mean \pm s.d. ($n = 5$). (d) Confirmation of *ATQ1*. NIL128, 155, 154 and 248 with a Kas-1 region in the *ATQ1* interval shows a %RGR similar to Kas-1. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). Graphical genotypes of NIL are shown beneath the graph.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Identification of an As(V) tolerance QTL in a Col-0 x Tsu-0 RIL population. (a) LOD score values from multiple QTL mapping analysis of As(V) tolerance plotted along chromosome 2 (left). Distribution of the As(V) tolerance phenotype values (%RGR) in 150 Col-0 x Tsu-0 recombinant inbred lines (RIL) (right). Parent values are represented above bars (Tsu-0; Col). Bimodality of the As(V) tolerance phenotype is represented by frequency of Tsu-0 (grey), Col (green) and heterozygous genotype (white) for the highest QTL-linked LOD value marker (c2_09429) among the RIL (right). (b) Graphical genotype of RIL212 used to confirm this QTL (box). (c) Confirmation of the major As(V) tolerance QTL detected in Col-0 and Tsu-0 ecotypes. As(V) tolerance phenotypes in Col-0, Tsu-0 and RIL212, measured as %RGR. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$).

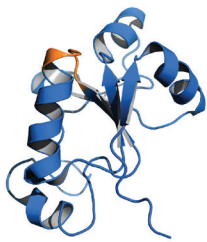
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Fine mapping of *ATQ1*. Genotype and As(V) tolerance phenotype, determined as %RGR, in selected lines from a NIL128 x Col *gl-1* (Col) F₂ population. The recombination breakpoints at the FTH1A and T1D16 interval are depicted; Kas-1 (red), Col *gl-1* (Col; green). *ATQ1* is located between markers F26H11 and T9I22.

Supplementary Figure 4

a

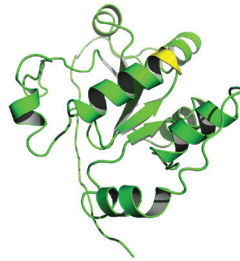


Model
AT5G66040

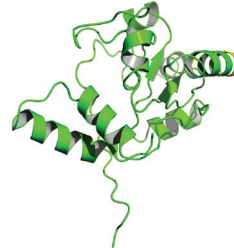
b



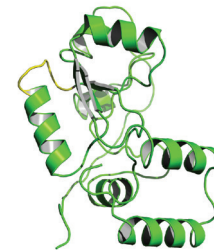
AtATQ1 Model 1
C-Score: -1.71



AtATQ1 Model 2
C-Score: -2.35



AtATQ1 Model 3
C-Score: -2.81

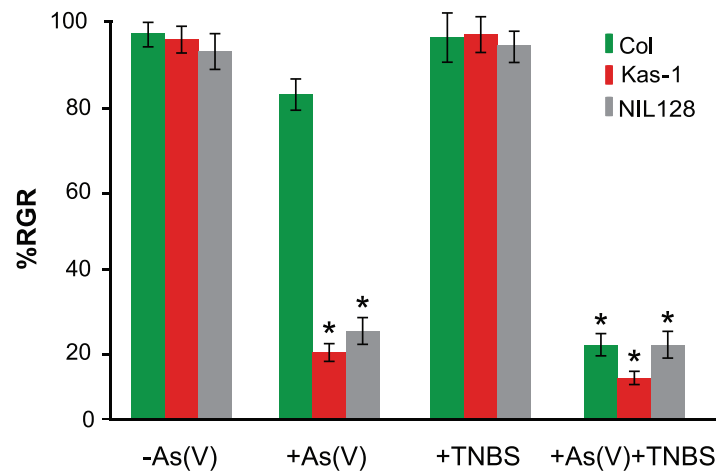


AtATQ1 Model 4
C-Score: -3.05



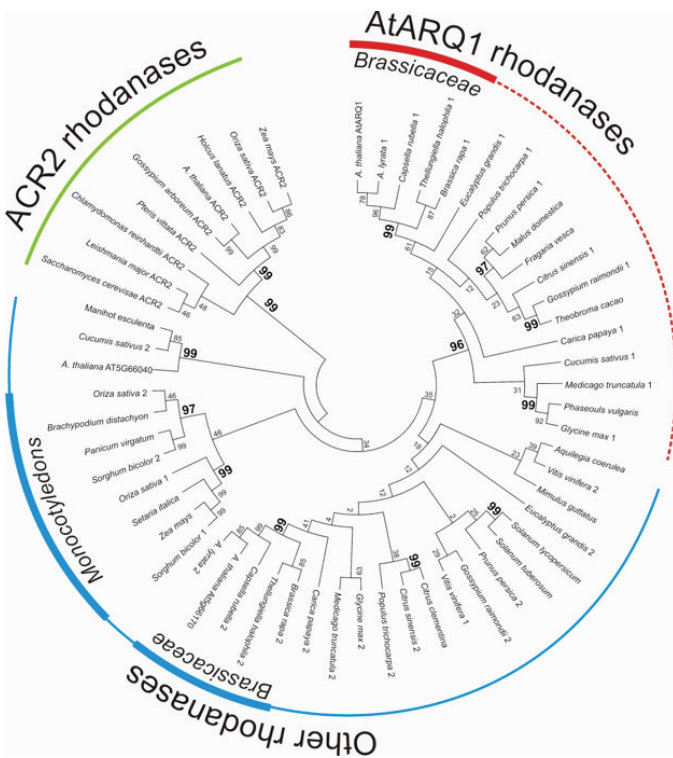
AtATQ1 Model 5
C-Score: -3.70

c



Supplementary Figure 4. AT2G21045 protein modeling and Arabidopsis TNBS sensitivity. (a) Solution structure of the sulfurtransferase protein At5g66040 (blue), the main template used to model ATQ1 structure. The rhodanase consensus sequence $C_{89}(X)_4R_{94}$ is in orange. (b) Top five 3D models of AT2G21045 protein (green) predicted by I-TASSER. Models are ordered according to confidence (C-score) ranking. $C_{113}(X)_4R_{118}$ motifs are in yellow. (c) TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid) promotes As(V) sensitivity in Col *gl-1* (Col) plants. Col (green), Kas-1 (red) and NIL128 (grey) plants grown alone, exposed to 15 μ M As(V), or to 1 mM TNBS alone or with 15 μ M As(V) for 24 h, then transferred to +Pi medium in a vertical position (24 h). The %RGR was determined. Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Phylogenetic relationships among rhodanase proteins.

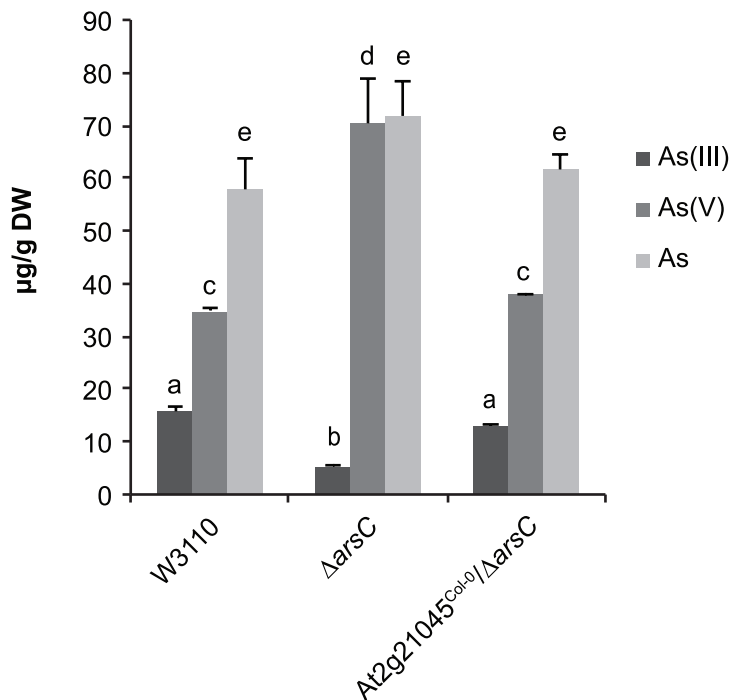
Neighbor-Joining tree including 49 sequences from 31 plant species selected by the highest homology to the rhodanase encoded by *AtARQ1* gene (At2g21045). They correspond to three *Arabidopsis thaliana* proteins (*AtARQ1*, *At5g66170* and *At5g66040*), a pair of proteins from each of 16 plant species (indicated with numbers 1 or 2 close to species names) and a single protein from each of 14 other plants. In addition, 9 ACR2 like proteins are included from protista, algae and plants. The bootstrap consensus tree inferred from 10000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. The analysis involved 58 amino acid sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 200 positions in the final dataset. Evolutionary analysis was conducted in MEGA6⁵¹.

Sequence accession numbers are:

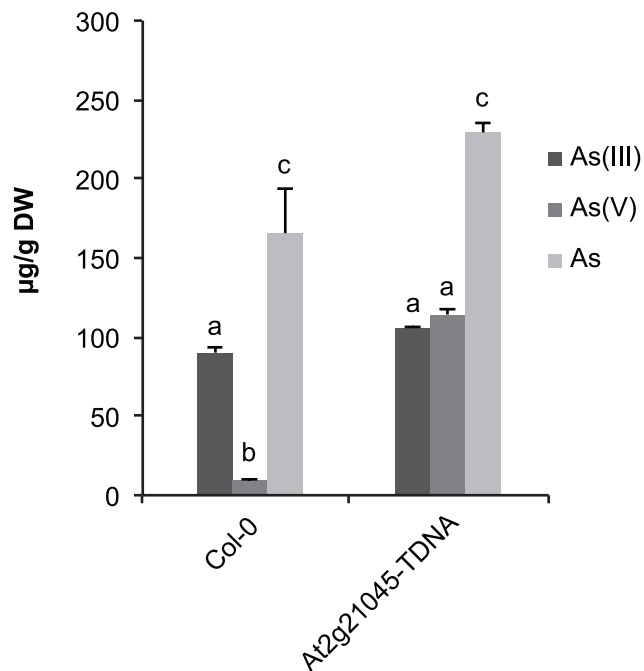
Arabidopsis thaliana *AtARQ1* (At2g21045): AAP37665; *Arabidopsis thaliana* *AT5G66040*: AAN38701; *Arabidopsis thaliana* *AT5G66170*: AAM10268; *Arabidopsis lyrata* 1: 899363; *Arabidopsis lyrata* 2: 496998; *Thellungiella halophila* 1: Thhalv10022902m; *Thellungiella halophila* 2: Thhalv10005118m; *Capsella rubella* 1: Carubv10025520m; *Capsella rubella* 2: Carubv10028451m; *Brassica rapa* 1: Bra002059; *Brassica rapa* 2: Bra012056; *Carica papaya* 1: supercontig 37.162; *Carica papaya* 2: supercontig 6.271; *Cucumis sativus* 1: CucsArabidopsis234370; *Cucumis sativus* 2: CucsArabidopsis044010; *Prunus persica* 1: ppa024101; *Prunus persica* 2: ppa011976; *Malus domestica*: MDP0000433388; *Mimulus guttatus*: mgv1a018856; *Vitis vinifera* 1: GSVIVG01018758001; *Vitis vinifera* 2: GSVIVG01018760001; *Manihot esculenta*: cassava4.1 017198; *Citrus sinensis* 1: orange1.1g041947m; *Citrus sinensis* 2: orange1.1g032621m; *Citrus clementina*: Ciclev10026690m; *Setaria italica*: Si031418m; *Aquilegia coerulea*: Aquca_006_00217.1; *Eucalyptus grandis* 1: Eucgr.E01127.1; *Eucalyptus grandis* 2: Eucgr.L00782.1; *Solanum tuberosum*: PGSC0003DMG400003573; *Solanum lycopersicum*: Solyc02g083730.2.1; *Medicago truncatula* 1: Medtr2g017630.1; *Medicago truncatula* 2: Medtr8g075420.1; *Glycine max* 1: Glyma12g02040.1; *Glycine max* 2: Glyma01g37010.1; *Phaseolus vulgaris*: Phvul.011G020400; *Gossypium raimondii* 1: Gorai.013G141700.1; *Gossypium raimondii* 2: Gorai.007G049000.3; *Populus trichocarpa* 1: Potri.014G131300.1; *Populus trichocarpa* 2: Potri.005G111200.2; *Fragaria vesca*: mma24304.1-v1.0-hybrid; *Theobroma cacao*: Thecc1EG032968t1; *Brachypodium distachyon*: Bradi3g00377.1; *Oriza sativa* 1: Os04g17660.1; *Oriza sativa* 2: Os02g01220.1; *Panicum virgatum*: Pavirv00038676m; *Sorghum bicolor* 1: Sb06g003340; *Sorghum bicolor* 2: Sb04g000410; *Zea mays*: AC204711.3 FG003; *Saccharomyces cerevisiae* ACR2: NP 015526; *Leishmania major* ACR2: AAS73185; *Gossypium arboreum* ACR2: AW666950; *Oriza sativa* ACR2: BE039986; *Chlamydomonas reinhardtii* ACR2: AW661050; *Arabidopsis thaliana* ACR2: AT5G03455: AAO39886; *Pteris vittata* ACR2: ADP20951; *Holcus lanatus* ACR2: AY704470; *Zea mays* ACR2: AY108501.

Supplementary Figure 6

a



b



Supplementary Figure 6. Arsenic species content. (a) Analysis of the arsenic species content in culture supernatants of *Escherichia coli* wild type (W3110), $\Delta arsC$ and $\Delta arsC$ expressing the *At2g21045* Col-0 allele ($At2g21045^{Col-0}/\Delta arsC$), exposed to 1mM As(V) (24 h). Bars show mean \pm s.d. ($n = 3$). (b) Arsenic species content in extracts of *Col-0* and $At2g21045$ T-DNA mutant plants exposed to 5 μ M As(V) (24 h). Values are mean \pm s.d. ($n = 5$). Means with different letters are significantly different (t -test, $p < 0.05$).

Supplementary Figure 7

a

Col-0 ATGTATACATATTCTCTCTCAACCTTTCTCATTGCAGAAGACAAACCAGAAAGAAAAGAAAAACAGATCACACCGAAGGCTTTCTCATGGAGGAAACAA
 Kas-1 ATG-ATACATATCCTCTCTTCAACCTTTCTCATTGCAAAAGACATACCAGAA-----AGAAAAACAGATCAACCGAAGGCTTTCTCATGGAGGAAACAA

Col-0 AACCAAAGACCGTTGAAGATGTTGAGACCGTTGATGTTTATACAGCTAAAGGCTTTCTTAGTACTGGTCACCGATATCTCGACGTAAGGACAAATGAAGA
 Kas-1 AACCAAAGACCGTTGAAGATGTTGAGACCGTTGATATTTTATACAGCTAAAGGCTTTCTTAGTACTGGTCACCGATATCTCGACGTAAGGACAAATGAAGA

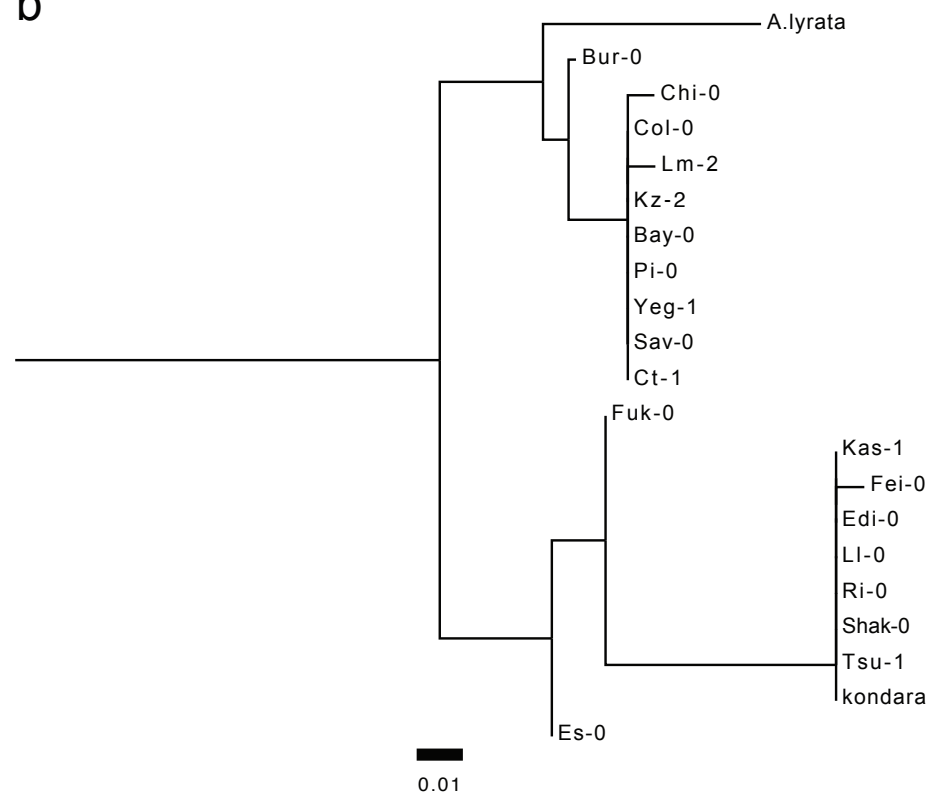
Col-0 ATTTGCCAAGAGTCATGTTGAGGAGGCTTTGAACATTCCCTTATATGTTCAAAACAGATGAAGGTAGGGTTATAAATCCTGATTTCCCTTTCTCAAGTGGCA
 Kas-1 ATTTGCCAAGAGTCATGTTGAGGAGGCTTTGAACATTCCCTTATATGTTCAAACAGATGAAGGTAGGGTTATAAATCCTGATTTCCCTTTCTCAAGTGGCA

Col-0 TCGGTTTGAAGAAAGATGAACATTTGATCGTGGCTTGTAAACGCTGGAGGAAGAGGAAGTCTGCTTGCCTTGATCTTCTTAACGAGGGGTACGACCATG
 Kas-1 TCGGTTTGAAGAAAGATGAACATTTGATCGTGGCTTGTAAACGCTGGAGGAAGAGGAAGTCTGCTTGCCTTGATCTTCTCAACGAGGGGTACGACCATG
 *

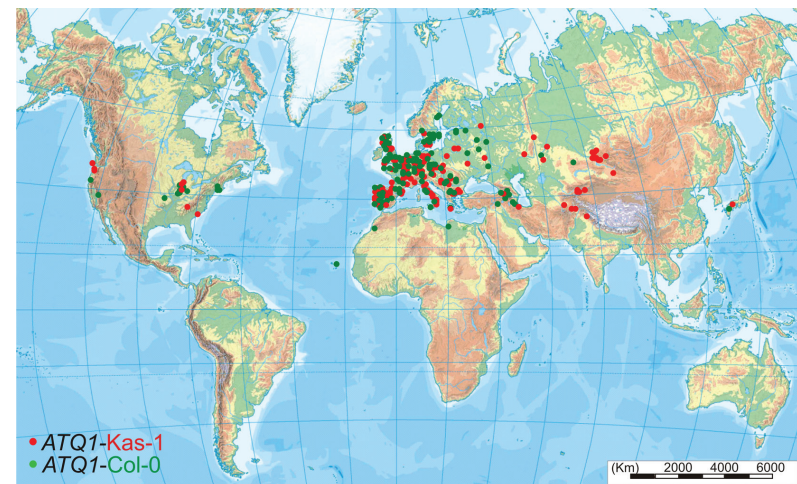
Col-0 TGGCTAACATGGGGGAGGCTACTCGGCTTGGGTTGACGCTGGATTGCGCCGGGGACAAACCCCGGAGACCTCAAGATTGCTTGCAAGTTCAGGCCAA
 Kas-1 TGGCTAACATGGGGGAGGCTACTCGGCTTGGGTTGACGCTGGATTGCGCCGGGGACAAACCCCGGGAGACCTCAAGATTGCTTGCAAGTTCAGGCCAA

Col-0 GGAAAACTAA
 Kas-1 GGAAAACTAA

b



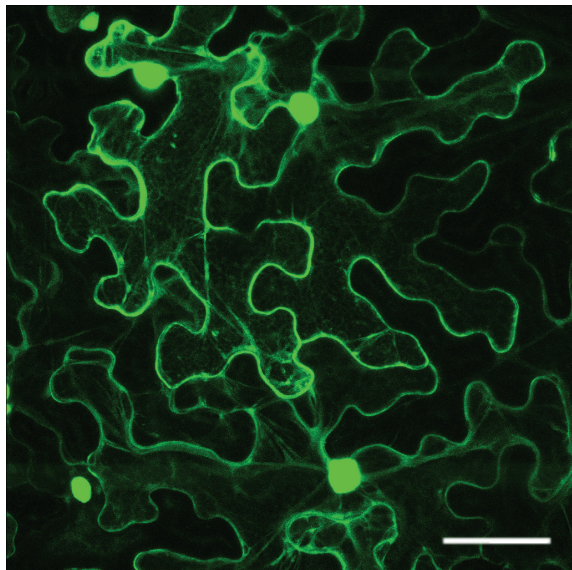
c



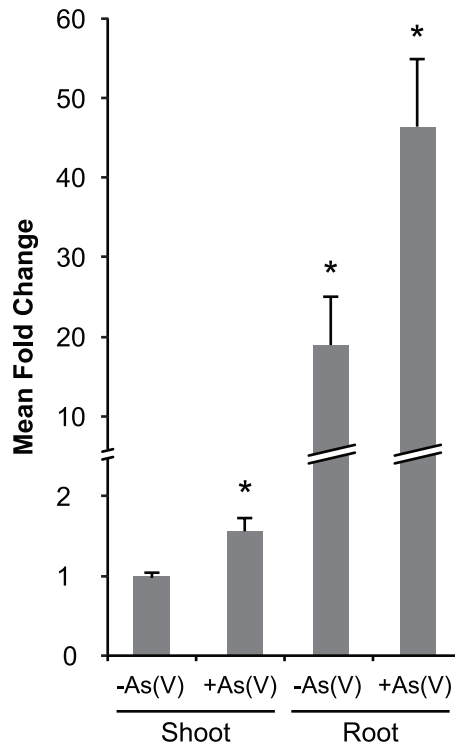
Supplementary Figure 7. Col-0 and Kas-1 define two haplogroups for the *AtARQ1* gene in *Arabidopsis thaliana*. (a) Nucleotide diversity between Col-0 and Kas-1 *AtARQ1* coding sequence. Compensatory indels and single nucleotide polymorphisms in Col-0 (green) and Kas-1 (red). *synonymous mutation. (b) Phylogram constructed using Clustal-W of *AtARQ1* coding sequences from 20 *Arabidopsis* accessions and *Arabidopsis lyrata*. (c) Geographic distribution of *Arabidopsis* accessions used, classified by Col-0 or Kas-1 haplogroup.

Supplementary Figure 8

a



b



Supplementary Figure 8. *AtARQ1* responds to As(V) and its protein localized in cytoplasm and nucleus. (a) Confocal analysis of *AtARQ1*-GFP-expressing *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells. *N. benthamiana* leaves transiently transformed with this construct were observed 72 hours post-agroinfiltration, Scale bar = 50 μ m. (b) qRT-PCR analysis of *AtARQ1* expression. Plants were grown alone or exposed to 30 μ M As(V) (24 h). RNA from roots and shoots was isolated separately and used for the analysis of the *AtARQ1* expression. Bars show mean \pm s.d. ($n = 2$).

Cytokinin Determines Thiol-Mediated Arsenic Tolerance and Accumulation

(Plant physiology, 2016)

Los resultados de este trabajo fueron presentados como póster en la “26th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR)” celebrada en París, Francia del 5-9 Julio del 2015

Cytokinin Determines Thiol-Mediated Arsenic Tolerance and Accumulation¹

Thotegowdanapalya C. Mohan², Gabriel Castrillo^{2,3}, Cristina Navarro, Sonia Zarco-Fernández, Eswarayya Ramireddy, Cristian Mateo, Angel M. Zamarreño, Javier Paz-Ares, Riansares Muñoz, Jose M. García-Mina, Luis E. Hernández, Thomas Schmölling, and Antonio Leyva*

Department of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain (T.C.M., G.C., C.N., C.M., J.P.-A., A.L.); Department of Analytical Chemistry, School of Chemical Sciences, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain (S.Z.-F., R.M.); Institute of Biology/Applied Genetics, Dahlem Centre of Plant Sciences, Freie Universität Berlin, Albrecht-Thaer-Weg 6, D-14195 Berlin, Germany (E.R., T.S.); Department of Environmental Biology (Agricultural Chemistry and Biology Group), Faculty of Sciences, University of Navarra, Sciences Building, 31008 Pamplona, Spain (A.M.Z., J.M.G.-M.); and Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Edif. de Biológicas BS13, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain (L.E.H.)

ORCID IDs: 0000-0001-8425-251X (T.C.M.); 0000-0002-5666-8865 (E.R.); 0000-0003-1966-0239 (A.M.Z.); 0000-0001-6352-9612 (J.M.G.-M.); 0000-0003-3492-5813 (L.E.H.).

The presence of arsenic in soil and water is a constant threat to plant growth in many regions of the world. Phytohormones act in the integration of growth control and stress response, but their role in plant responses to arsenic remains to be elucidated. Here, we show that arsenate [As(V)], the most prevalent arsenic chemical species in nature, causes severe depletion of endogenous cytokinins (CKs) in the model plant *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). We found that CK signaling mutants and transgenic plants with reduced endogenous CK levels showed an As(V)-tolerant phenotype. Our data indicate that in CK-depleted plants exposed to As(V), transcript levels of As(V)/phosphate-transporters were similar or even higher than in wild-type plants. In contrast, CK depletion provoked the coordinated activation of As(V) tolerance mechanisms, leading to the accumulation of thiol compounds such as phytochelatins and glutathione, which are essential for arsenic sequestration. Transgenic CK-deficient *Arabidopsis* and tobacco lines show a marked increase in arsenic accumulation. Our findings indicate that CK is an important regulatory factor in plant adaptation to arsenic stress.

Since the inception of life, arsenic in the biosphere has been a constant challenge to the survival of life forms. Although all organisms on earth have developed strategies to cope with this extremely toxic metalloid (Rosen, 2002; Tripathi et al., 2007), arsenic currently poses a major worldwide environmental problem (Naujokas et al., 2013).

Arsenate [As(V)] is the most abundant chemical form of arsenic. Due to its structural similarity to phosphate (Pi), it is easily incorporated into plants and other organisms through Pi transporters. Once taken up by the cell, As(V) is rapidly reduced to arsenite [As(III)] by As(V) reductases. As(III) is either extruded from the cytoplasm or is sequestered by phytochelatins (PCs) and other related thiol-containing compounds and is compartmentalized into vacuoles (Tripathi et al., 2007).

In plants, when As(V) is perceived, Pi transporters are rapidly downregulated, and thiol compound accumulation increases concomitantly to cope with the metalloid. These two responses are key As(V) tolerance strategies for natural plant populations (Meharg and Macnair 1992; Bleeker et al., 2006). Accumulation of PC and other related thiol-containing compounds is widely used by plants for heavy metal detoxification. PCs are

synthesized from glutathione (GSH) by the enzyme PHYTOCHELATIN SYNTHASE1 (PCS1). As(V) induces PCS1, together with two other genes involved in GSH biosynthesis: γ -GLUTAMYL CYSTEINE SYNTHETASE and GLUTATHIONE SYNTHETASE (GSH2; Sung et al., 2009). In addition, As(III) activates GSH and PC accumulation; As(V) reductase activity is thus essential for arsenic tolerance (Bleeker et al., 2006). *Arabidopsis thaliana* ARSENATE REDUCTASE QTL1 (AtARQ1, At2g21045; also termed HAC1; Chao et al., 2014), an As(V) reductase-encoding gene, is also transcriptionally regulated by As(V) (Sánchez-Bermejo et al., 2014). Arsenic tolerance thus requires coordinated expression of several As(V)-responsive genes involved in As(V) reductase activity and PC accumulation.

Exposure to stress arrests plant growth. When plants perceive As(V), for example, root growth is immediately inhibited (Li et al., 2007; Shri et al., 2009; Yoon et al., 2015). Root meristem activity can be restored by removing As(V) from the medium. Root growth recovery depends on the function of an As(V) reductase that is essential for arsenic detoxification (Sánchez-Bermejo et al., 2014), which supports the idea that plants are able to integrate arsenic tolerance mechanisms

into developmental programs. In general, phytohormones are involved in reconfiguration of developmental patterns in response to abiotic stress (Peleg and Blumwald, 2011; Zwack and Rashotte, 2015), although their role in arsenic-mediated growth control is currently unknown.

Here, we characterized the involvement of the hormone cytokinin (CK) in the As(V) response. We found that As(V) provokes severe depletion of endogenous CK levels, leading to activation of As(V) tolerance mechanisms, including As(V) reductase activity and PC and GSH accumulation, all critical for arsenic detoxification. CK is therefore an essential component of plant strategies that lead to As(V) tolerance.

RESULTS

CK-Deficient Plants Have an Enhanced As(V) Tolerance Phenotype

In response to As(V), expression of the As(V)/Pi-transporter gene *PHT1;1* is quickly repressed, which provides an efficient strategy for As(V) tolerance (Castrillo et al., 2013). CK acts as a negative regulator of *PHT1;1* expression in response to Pi starvation (Martín et al., 2000; Franco-Zorrilla et al., 2002; Wang et al., 2006). To determine the effect of CK on *PHT1;1* repression in response to As(V), we performed a time course analysis of *PHT1;1* transcript accumulation in As(V)-exposed plants. We used *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) lines that

constitutively express the *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE1* (*CKX1*) gene (35S:*CKX1*; Werner et al., 2003); all bioactive CK levels are strongly decreased in these plants (Werner et al., 2003, 2010; Nishiyama et al., 2011). qRT-PCR analysis showed that in the absence of As(V), CK deficiency increased *PHT1;1* expression relative to that observed in wild-type plants, in line with previous studies. After As(V) exposure, *CKX1*-overexpressing lines rapidly repressed *PHT1;1* expression (2.7-fold) to a similar degree or even more than in wild-type plants (Fig. 1A). Absolute mRNA levels for *PHT1;1* after As(V) exposure are thus similar in *CKX1*-overexpressing and wild-type plants.

As CK is defined as a negative regulator of several stress responses (Tran et al., 2007; Srivastava et al., 2009; Werner et al., 2010; Nishiyama et al., 2011; Jeon and Kim, 2013), we examined the As(V) tolerance phenotype using CK-depleted transgenic lines and mutants. Since *CKX1*-overexpressing lines and CK signaling mutants show increased root length (Werner et al., 2003, 2010; Riefler et al., 2006), we compared root growth inhibition in the presence of As(V) (Fig. 1B) relative to root length in the corresponding plants grown in As(V)-free media (Supplemental Fig. S1). The fold change in growth reduction between these conditions showed that growth arrest was lower in all mutant and transgenic lines, with lower CK levels than wild-type ecotype Columbia (Col-0) plants (Fig. 1, B and C). These lines included the 35S:*CKX1* transgenic line as well as the triple mutant *ipt 3 5 7* and the *cyp735a1 a2* double mutant (both with impaired CK biosynthesis), and the double receptor mutant *ahk2/ahk3* with reduced CK sensitivity (Fig. 1, B and C). Relative root growth inhibition in the CK mutants was .45-fold, while it was .6-fold in wild-type plants. Similar *PHT1;1* mRNA levels in wild-type and CK mutants, with less As(V) sensitivity in the latter, suggest that other mechanisms involved in arsenic tolerance must be under CK control.

As(V) Reduces Endogenous CK Levels

The arsenic tolerance phenotype shown by CK-depleted transgenic lines and CK signaling mutants led us to test the As(V) effect on endogenous CK levels. Quantification of biologically active CK metabolites (iP, tZ, cZ) and their ribosides (iPR, tZR, cZR) in As(V)-exposed *Arabidopsis* plants showed that concentrations of all species were significantly reduced after As(V) exposure, particularly of tZ-type species (Fig. 2A). The As(V) tolerance phenotype of the *cyp735a1 a2* double mutant, in which tZ-type CK are specifically reduced (Kiba et al., 2013), was similar to that of *CKX1*-overexpressing lines, in which the level of all CK metabolites is lower (Fig. 1, B and C). Consistent with lower CK levels, the *IPT* genes (*IPT3*, *IPT5*, and *IPT7*) responsible for biosynthesis of the bulk of CK during vegetative growth were markedly down-regulated after As(V) exposure (Fig. 2B). Expression of five *CKX*

¹This work was financially supported by fellowships to T.C.M. from the La Caixa/CNB International PhD Programme, to G.C. and C.N. from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), and to S.Z. from the EU Orque-Sudoe Programme SOE3/P2/F591. This work was also supported by funding from the Groupe Roullier, the German Federal Ministry of Science and Technology in the frame of the ROOT project (grant 0315704 to T.S.), and the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants EUI2009-03993, BIO2011-25306 and BIO2014-55741-R to A.L.; BIO2014-60453-R, BIO2011-29085 to J.P.A.; AGL2010-15151 and AGL2014-53771-R to L.E.H.).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: HHMI and Dept. of Biology, CB#3280, Carolina Center for Genome Sciences, 4260 Genome Sciences Bldg, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3280, USA.

* Corresponding author e-mail: aleyva@cnb.csic.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Antonio Leyva (aleyva@cnb.csic.es).

T.C.M. and G.C. performed most of the experimental work, with large contributions from C.N. and important support from C.M.; tobacco experiments in response to arsenate were performed by E.R. under the supervision of T.S.; cytokinin quantification was performed by A.M.Z. under the supervision of J.M.G.-M.; arsenic determination and speciation analysis were performed by S.Z.-F. under the supervision of R.M.; L.E.H. determined the phytochelatin profile; A.L., J.P.A., T.C.M., G.C., E.R., and T.S. analyzed the data; A.L. designed experiments with contributions from T.C.M., G.C., E.R., J.P.-A., and T.S., and wrote the paper with contributions from all authors.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.00372

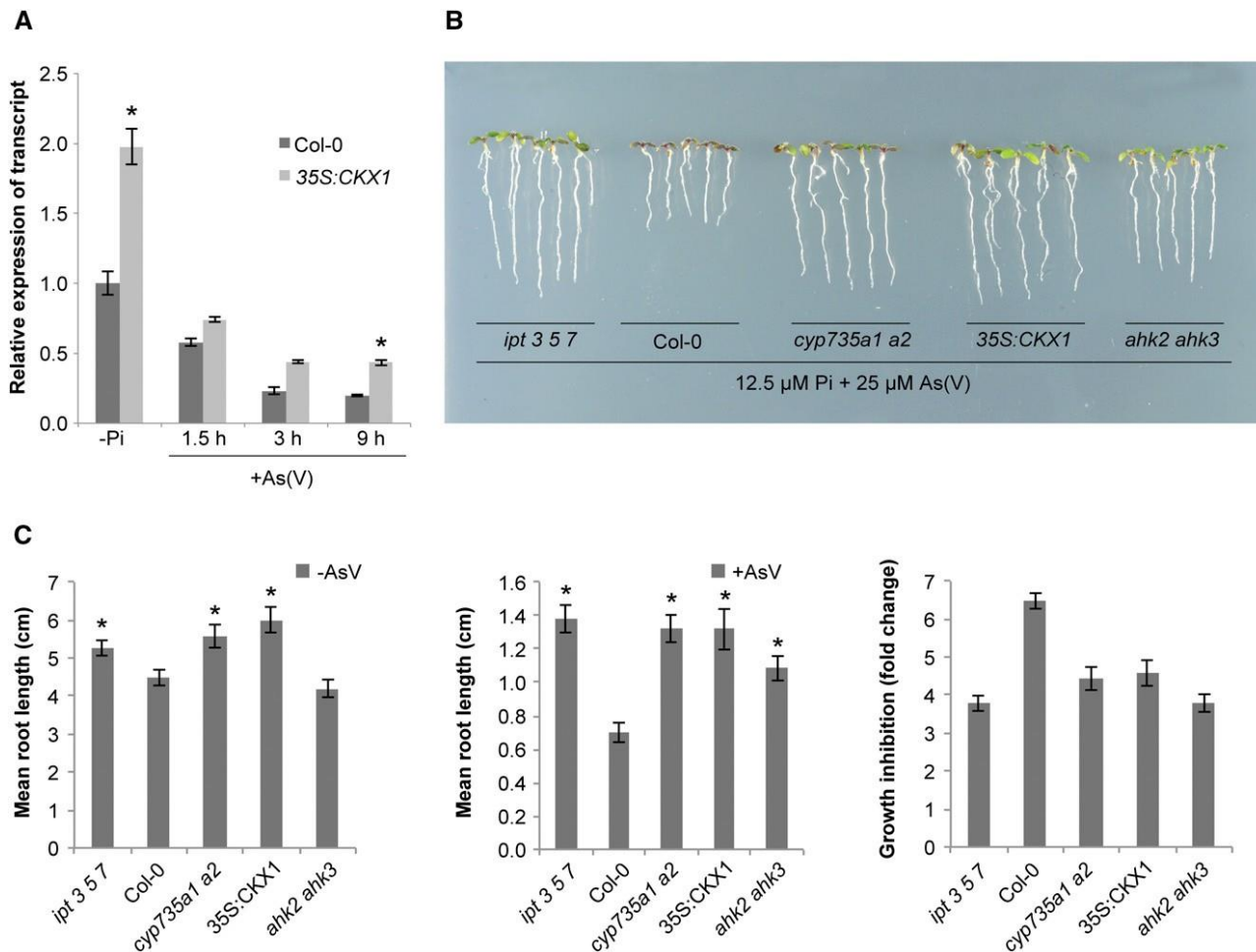


Figure 1. Reduction of endogenous CK confers As(V) tolerance. A, qRT-PCR analysis of PHT1;1 expression in wild-type plants (Col-0) and in a 35S:CKX1-overexpressing line grown in +Pi medium for 7 d, transferred to 2Pi medium for 3 d, then transferred to 2Pi liquid medium for the indicated time, alone (2Pi) or with 30 mM As(V). Values show mean \pm SD ($n = 3$). B, As(V) tolerance phenotypes of *ipt 3 5 7*, wild-type (Col-0), *cyp735a1 a2*, 35S:CKX1, and *ahk2 ahk3* plants grown on 12.5 mM Pi supplemented with 25 mM As(V) for 10 d. C, Root length of indicated mutant, transgenic, and wild-type plants grown alone (left) or with As(V) (center) were measured in plants growth as described in B. Right, root growth inhibition (fold change) by As(V) compared to growth of corresponding plant types in the absence of As(V). Values show mean \pm SD ($n = 5$). Means are significantly different (Student's *t* test, * $P < 0.01$).

family members (CKX1, CKX3, CKX4, CKX5, and CKX7) was also repressed, which might be the consequence of lower CK synthesis (Fig. 2C). As(V) thus reduces CK levels, particularly of the tZ type, which suggests the biological relevance of CK depletion for As(V) tolerance in plants.

To further understand the basis of CK depletion in response to As(V), we compared a transcriptome profile of the As(V) response (Castrillo et al., 2013) with a meta-analysis of CK microarray data (Brenner and Schmülling, 2015). We found that As(V) down-regulates a significant number of genes that are considered CK core-inducible (36 of 65 TOP65CytK), including CK biosynthesis genes and response regulator genes (Table 1; Supplemental Table S1). As(V) repression of three CK core responsive genes was confirmed by qRT-PCR expression analysis (Supplemental Fig. S2). These data

showed that the CK receptor gene CRE1/AHK4 was also significantly down-regulated in response to As(V), which would probably result in lower CK signaling. Indeed, reduced expression of numerous CK-responsive genes supports this idea (Supplemental Table S1; Supplemental Fig. S2).

The Plant Detoxification Machinery Is Modulated by Endogenous CK

To identify the molecular mechanism that underlies As(V) tolerance in response to CK depletion, we tested whether CK deficiency alters essential As(V) resistance mechanisms in plants. As(V) repression of the As(V)/Pi transporter gene, an essential strategy in As(V) tolerance, was very efficient in the CKX1-overexpressing lines; however, Pi transporter transcript levels were

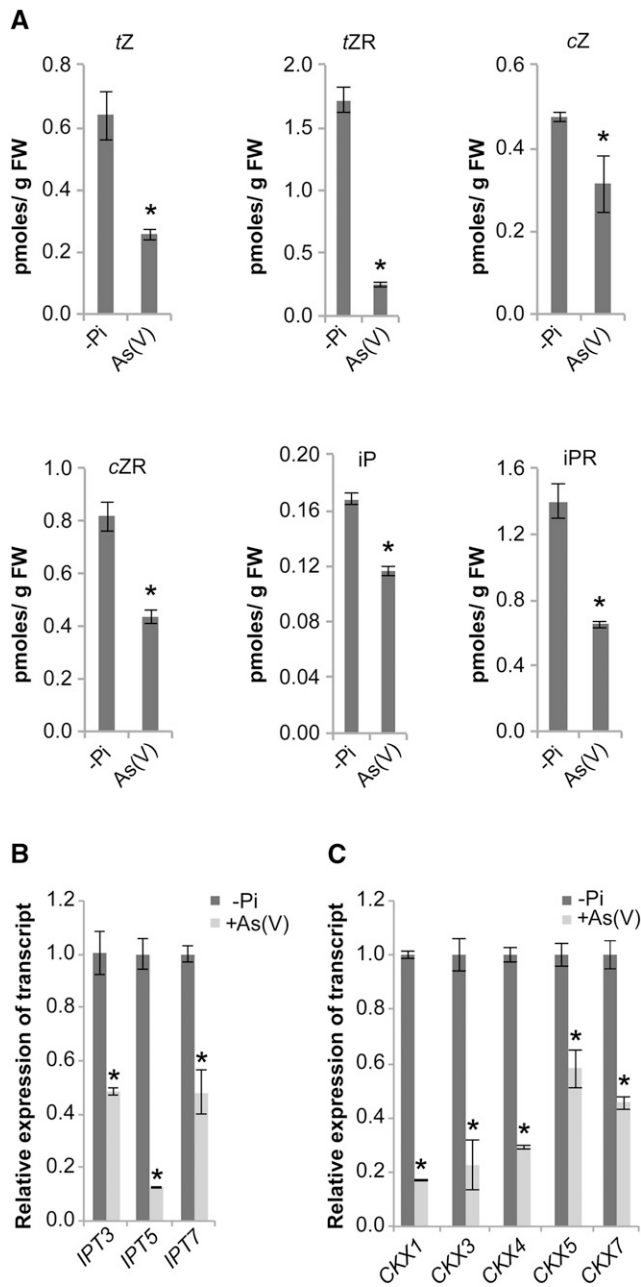


Figure 2. As(V) depletes endogenous CKs. A, Wild-type plants (Col-0) were grown in +Pi medium for 7 d, transferred to -Pi medium for 3 d, and then to -Pi liquid medium alone or with 30 mM As(V) for 6 h. CK levels were analyzed as pmol/g fresh weight (FW) of whole plants. Values show mean \pm SD ($n = 3$). Means are significantly different (ANOVA, * $P < 0.05$). B and C, As(V) inhibits expression of CK metabolism genes. qRT-PCR analysis of IPT (B) and CKX (C) gene expression. Treatment was as in A. Values show mean \pm SD ($n = 3$), t test * $P < 0.05$.

higher in the As(V)-treated CKX1-overexpressing line than in wild-type plants (Fig. 1A). Alternative mechanisms must therefore be invoked to explain the increased As(V) tolerance of low CK-accumulating plants. To determine whether CKs are involved in regulation of the detoxification machinery, we analyzed expression

of the biothiol biosynthetic genes *g*-GLUTAMYL-CYSTEINE SYNTHETASE, *GSH2*, and *AtPCS1* in wild-type and CKX1-overexpressing plants (Fig. 3). Since As(III) is necessary for PC biosynthesis and accumulation, the action of As(V) reductases is essential for As(V) tolerance in plants (Bleeker et al., 2006); we thus also analyzed expression of the recently identified As(V) reductase gene *AtARQ1/HAC1* (Chao et al., 2014; Sánchez-Bermejo et al., 2014). qRT-PCR expression analysis of

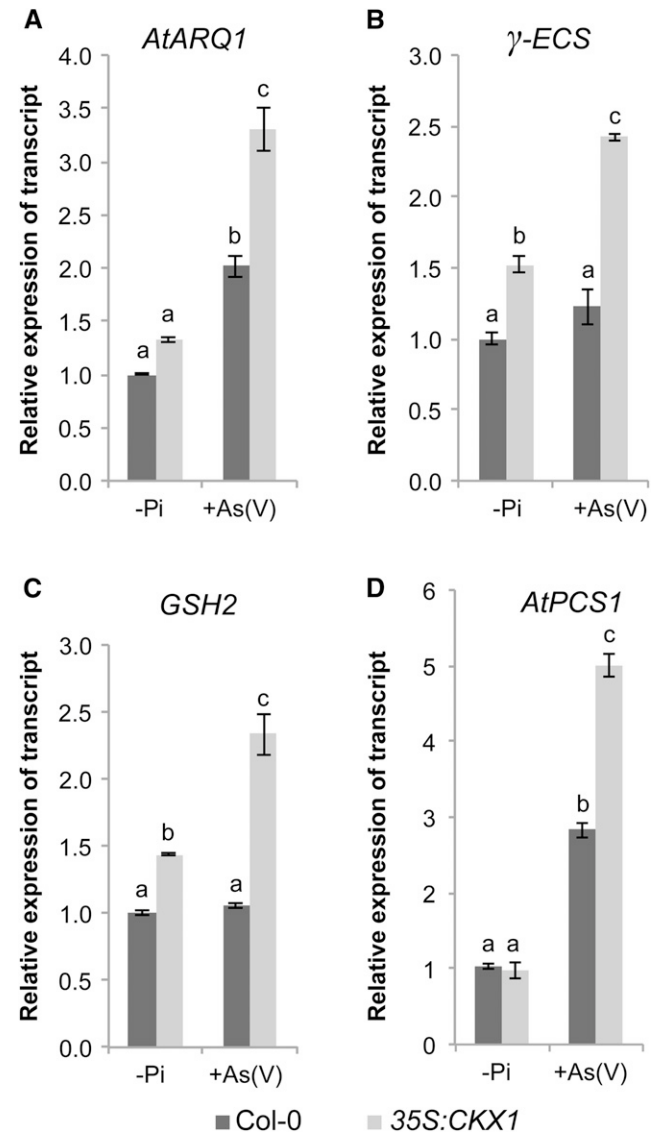


Figure 3. Genes involved in thiol compound accumulation are up-regulated in CK-depleted transgenic plants. A to D, qRT-PCR expression analysis of *AtARQ1* (A), *g2ECS* (B), *GSH2* (C), and *AtPCS1* (D) in Col-0 and 35S:CKX1. Plants were grown in +Pi medium for 7 d, transferred to 2Pi medium for 3 d, and then to 2Pi liquid medium alone (2Pi) or with 20 mM As(V) [+As(V)] for 6 h. Expression was analyzed in whole seedlings except for *AtARQ1*, for which only roots were used. Values show mean \pm SD ($n = 3$). Means labeled with the same letter indicate no significant difference, based on Tukey's posthoc test ($\alpha = 0.05$).

wild-type plants showed that PCS1 and AtARQ1 transcript accumulation was induced after 6-h As(V) exposure. In the CKX1-overexpressing line, the As(V) responsiveness of AtARQ1 and other PC biosynthetic genes (g2ECS, GSH2, and AtPCS1) was increased compared to wild-type controls (Fig. 3). In accordance with these findings, microarray data for CK-treated Arabidopsis seedlings showed that, in response to this phytohormone, AtPCS1 and AtARQ1 are down-regulated 4.0- and 4.4-fold, respectively (Brenner et al., 2005). In the CKX1-overexpressing line, these genes were not up-regulated in the absence of As(V) (Fig. 3). Nonetheless, transcripts altered in response to CK do not always behave as opposites in CK-deficient plants (Brenner and Schmülling, 2012). These results thus indicate that CK negatively regulates the expression of genes involved in biothiol accumulation and that the As(V) tolerance phenotype of the CKX1-overexpressing plants is due at least in part to the up-regulation of genes related to the As(V) detoxification machinery.

The contribution of PC accumulation to the As(V) tolerance phenotype shown by the CKX1-overexpressing line was evaluated by analyzing the effect of L-buthionine sulphoximine (BSO) on As(V) sensitivity in wild-type and CKX1-overexpressing plants. BSO is a specific inhibitor of g2ECS activity and thus particularly effective for PC depletion. Wild-type Arabidopsis plants exposed to this compound perfectly mimic the metal sensitivity of PC biosynthetic mutants (Howden et al., 1995). Coinciding with previous observations (Ortega-Villasante et al., 2005), we found that BSO had no effect on root growth in the absence of As(V), even at the highest concentration tested (Supplemental Fig. S3). In the presence of the metalloid, increased BSO concentrations greatly

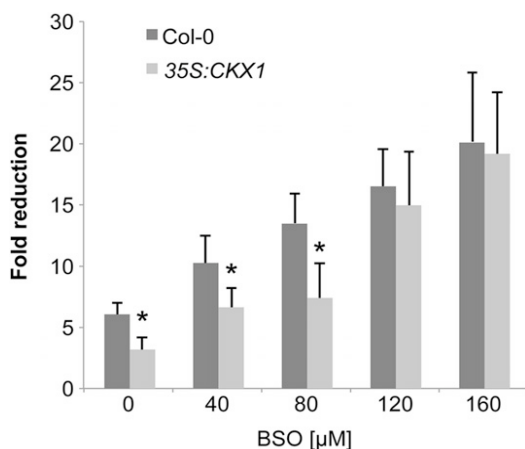


Figure 4. As(V) sensitivity to BSO increased preferentially in CK-depleted plants. Plants were grown on Johnson medium with 12.5 mM Pi in a vertical position for 5 d and then transferred to the same medium with 20 mM As(V) alone or with increasing concentrations of BSO. Root growth inhibition (fold change) was determined by quantifying root elongation after 3 d of As(V) exposure alone or with BSO. Bars show mean 6 SD ($n = 15$). * $P < 0.0001$ (Student's t test).

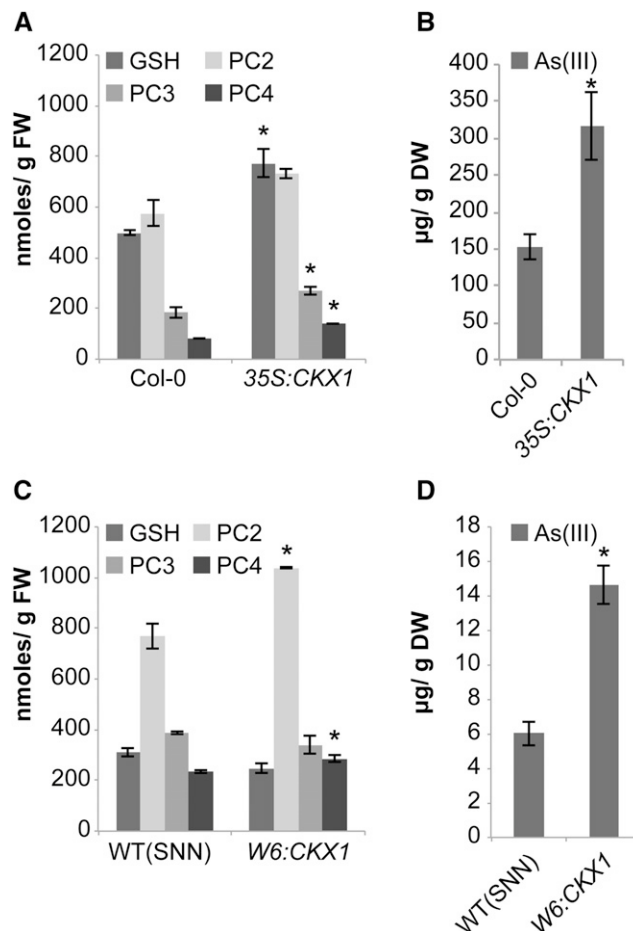


Figure 5. Phytochelatin, GSH, and As(III) accumulation increased in response to CK depletion in Arabidopsis and tobacco. GSH, PCs PC2, PC3, PC4 A, and As(III) (B) levels were determined in Col-0 and 35S:CKX1 Arabidopsis seedlings. Quantification of thiols (C) and As(III) (D) in wild-type (SNN) and W6:CKX1 tobacco roots. Phytochelatin and As(III) were quantified as described in "Methods." Values show mean 6 SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ (Student's t test). FW, fresh weight; DW, dry weight.

enhanced As(V) sensitivity; we therefore analyzed root growth inhibition after brief exposure to As(V). In plants exposed to BSO, As(V) sensitivity increased preferentially in the CKX1-overexpressing lines compared to wild-type plants (Fig. 4 ;Supplemental Fig. S3). In the presence of As(V) and at relatively high BSO concentrations, CKX1-overexpressing and wild-type plants showed similar root growth. As(V) exposure in wild-type and the CKX1-overexpressing line showed that CK depletion led to a clear increase in PC2, PC3, and PC4 and their precursor, GSH (Fig. 5A), and that these plants accumulated more than twice as much As(III) as wild-type plants (Fig. 5B). These observations strongly support the concept that severe depletion of endogenous CK leads to enhanced PC accumulation, which suggests that the higher arsenic tolerance in the CKX1-overexpressing line is caused to a great extent by the higher PC levels in these plants. Once arsenic is perceived, CK depletion modulates Arabidopsis

detoxification capacity and is thus a key factor in plant tolerance and adaptation to As(V).

Various strategies have been used to enhance arsenic tolerance and accumulation in plants (Dhankher et al., 2006; Zhu and Rosen, 2009; Song et al., 2010). Our data suggest CK depletion as an alternative approach to increase the efficiency of arsenic accumulation. CK reduction also leads to a notable increase in root biomass, which could contribute to better arsenic extraction from soil (Werner et al., 2010). A CK decrease thus confers two important characteristics for arsenic hyperaccumulation: increased levels of thiol-containing compounds and enhancement of total root area. To analyze potential applications of CK reduction for arsenic phytoaccumulation in other plant species, we measured PC levels and As(III) accumulation in CKX1-expressing tobacco roots (Fig. 5, C and D). Since constitutive CKX1 expression provokes pleiotropic effects in the aerial part of the plant, we analyzed tobacco plants that express the CKX1 gene under the control of the WRKY6 promoter (Werner et al., 2010). These plants are particularly suitable for such experiments, as this promoter is mainly root specific and As(V) responsive (Castrillo et al., 2013). Similar to Arabidopsis, root-specific CKX1 expression in response to As(V) provoked an increase in total PC levels in tobacco roots, particularly of PC2 (Fig. 5C). As(III) quantification in CKX1-expressing tobacco plants showed that root-specific CK depletion led to a 2-fold As(III) increase compared to wild-type plants (Fig. 5D). These results suggest CK depletion as a suitable strategy to enhance arsenic accumulation in different plant species.

DISCUSSION

The biological role of phytohormones in plant tolerance to arsenic is currently unknown. Transcriptome profiling of a few plant species indicates that several phytohormones might be involved in plant growth regulation in response to arsenic (Yu et al., 2012; Fu et al., 2014), although downstream targets remain to be determined. Here, we found that CK modulates arsenic detoxification in plants. CKX1-overexpressing lines depleted of endogenous CK, plants with reduced CK

synthesis, and CK signaling mutants showed a clear arsenic tolerance phenotype. CK acts as a negative regulator of plant responses to several forms of stress. The arsenic tolerance phenotype of the CK-deficient plants and signaling mutants nonetheless suggests that CK coordinates arsenic detoxification mechanisms. As(V) tolerance is achieved mainly through the combined action of two specific responses, prevention of As(V) uptake by suppression of PHT1;1, the most active As(V)/Pi-transporter (Castrillo et al., 2013), and through detoxification by As(III) complex formation with thiol compounds and sequestration into the vacuoles (Schmöger et al., 2000). Although CK negatively regulates the As(V)/Pi transporter (Martín et al., 2000), As(V)-mediated down-regulation of PHT1;1 was somewhat more efficient in the CK-depleted lines than in wild-type plants. PHT1;1 transcript levels after As(V) exposure were similar in CK-depleted transgenic and wild-type plants, however, which implies that the effect of CK depletion on PHT1;1 expression is unlikely to be responsible for the increased As(V) tolerance of CKX1-overexpressing lines. Repression of As(V)/Pi transporters in response to As(V) is controlled by the WRKY6 transcription factor (Castrillo et al., 2013). Our results support the idea that As(V) down-regulation of the Pi transporter is controlled preferentially by WRKY6 action. In contrast, As(V) reductase gene expression and thiol compound accumulation was increased in CK-depleted plants, which suggests that CK controls activation of the detoxification machinery responsible for As(V) tolerance.

As(V) caused a significant reduction in endogenous CK levels, which coincides with reduced expression of CK synthesis genes (Fig. 2B). Our analyses showed that As(V) reduces the expression of CK-inducible genes (Table I). As(V) efficiently represses the CYP735A gene, responsible for biosynthesis of tZ-type CK in roots (Kiba et al., 2013; Ramireddy et al., 2014). In addition, the arsenic-tolerant phenotype of the Arabidopsis cyp735a1 a2 double mutant was identical to that of the CKX1-overexpressing line (Fig. 1, B and C). tZ-type CKs therefore appear to have a major role in the repression of arsenic tolerance mechanisms, probably because this CK species is synthesized in roots (Kiba et al., 2013), where biothiols are essential for As(III) sequestration.

Table I. As(V) down-regulates CK core response genes. The total number of up- and down-regulated genes after As(V) exposure (1.5 or 8 h; Castrillo et al., 2013) was compared with 65 genes identified as CK core response genes (TOP65CytK) from a meta-analysis of microarray data (Brenner and Schmülling, 2015). Numbers for observed/expected indicate As(V)-regulated genes that overlap with CK core response genes. The expected number of overlapping genes was calculated assuming random distribution. Enrichment was assessed using a hypergeometric test with Bonferroni correction; significant overrepresentation is in italics ($P < 0.05$).

Array	TOP65CytK				
	Gene Expression	No. of Genes	Observed	Expected	P-Value
As(V) -1.5 h	Up	1936	3	3.39	1
	Down	1518	14	2.66	1.19E-06
As(V) -8 h	Up	1263	3	2.62	1
	Down	926	32	1.92	3.93E-31

Endogenous CK depletion in response to As(V) alters the expression of genes involved in arsenic detoxification. CK negative regulation is not limited to genes involved in GSH and PC biosynthesis, but also affects expression of the As(V) reductase gene *AtARQ1*. As(III) and As(V) increase the intracellular thiol content in arsenic hyperaccumulator plants (Bleeker et al., 2006); As(V) reductase activity is therefore a prerequisite for arsenic tolerance and accumulation. CK also represses sulfur transporters (Maruyama-Nakashita et al., 2004), and As(III) causes severe sulfur starvation and induces expression of sulfur transporters (Reid et al., 2013). These data support the idea that sulfur is critical for increased biosynthesis of PC and other thiol-related compounds, which leads to arsenic accumulation. The use of an inhibitor of GSH and PC biosynthesis showed that the As(V) tolerance phenotype in CK-depleted Arabidopsis plants is due in great measure to increased accumulation of thiol compounds. Although these compounds have a limited role in some arsenic hyperaccumulator plants (Webb et al., 2003), As(III) is the major arsenic species that accumulates in hyper- and nonaccumulator plant vacuoles. Enhanced As(V) reductase gene expression in response to CK depletion is therefore a critical prerequisite for arsenic accumulation in both plant types. Reduction of endogenous CK levels in response to As(V) is thus a central factor in arsenic tolerance and accumulation in plants.

Hitherto only a few transgenic approaches have been used to coordinate expression of key genes for arsenic phytoremediation (Dhankher et al., 2002; Zhu and Rosen, 2009). Efficient use of a system-wide approach that integrates all responses to increase arsenic accumulation would require identification of the master regulatory genes that underlie the response to arsenic. The Arabidopsis and tobacco CKX1-overexpressing plants used in this study accumulate more cadmium as well as nutrient elements, associated with their increased root biomass and possibly with deregulated expression of the respective transporter genes (Werner et al., 2010). Our results show that CK reduction not only increases root biomass but also promotes activation of the metal(loid) detoxification machinery, a major cause of As(III) accumulation. We suggest CK depletion as a strategy to increase arsenic accumulation in non-hyperaccumulator plants.

Our findings show that CK acts as a negative regulator of the response to As(V). Reduction of CK levels in response to the metalloid stimulates the detoxification machinery that leads to As(III) accumulation. Further experiments are needed to determine how plants sense the amount of biothiol elicited by CK depletion to coordinate As(V) uptake and detoxification. Identification of CK as an integral part of the As(V) response offers a new understanding of how plants integrate phytohormone signaling pathways with adaptation to stress and provides an additional molecular component with which to engineer arsenic tolerance in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Growth Conditions

We used Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) seeds of Col-0, 35S:CKX1 (Werner et al., 2003), the CK receptor mutant *ahk2 ahk3* (*ahk2-5/ahk3-7*; Riefler et al., 2006), and the CK biosynthetic mutants *ipt3 5 7* (*ipt3-2/ipt5-3/ipt7-1*; Miyawaki et al., 2006) and *cyp735a1 a2* (*cyp735a1-1/cyp735a2-2*; Kiba et al., 2013). The last two lines were kindly provided by Tatsuo Kakimoto (Laboratory of Plant Growth and Development, Osaka University Japan) and Hitoshi Sakakibara (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan), respectively. For tobacco (*Nicotiana tabacum*) experiments, we used cultivar SNN as the wild type and transgenic line WRKY6:CKX1#29 (Werner et al., 2010). Arabidopsis seedlings were grown on Johnson medium (Johnson et al., 1957) without Pi or supplemented with Pi (KH_2PO_4) alone or with As(V) ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) at distinct concentrations, depending on the experiment. For all molecular, phenotypic, and biochemical analyses, Arabidopsis plants were grown in a growth chamber on a 16-h-light/8-h-dark regime (24°C/21°C).

Tobacco seeds were germinated on Murashige and Skoog (MS) with 3% Suc plates and cultivated in long-day conditions (16-h light/8-h dark) at 22°C for 10 d. Seedlings at a similar developmental stage were then transferred to a hydroponic system containing 0.1-strength Hoagland solution (Krämer et al., 1996) and cultivated for another 4 weeks. Medium was aerated and renewed every five days.

Phenotypic Analysis

For As(V) tolerance analysis, Arabidopsis plants were grown on Johnson medium with 12.5 mM Pi alone or with 25 mM As(V) in a vertical position for 10 d. To determine root growth retardation in response to As(V), main root length was measured in these plants using ImageJ software (Schneider et al., 2012).

To analyze the effect of BSO on As(V) tolerance, Arabidopsis plants were grown on Johnson medium with 12.5 mM Pi in a vertical position for 5 d. Plants were then transferred to the same medium with 20 mM As(V) alone or with increasing BSO concentrations. Root growth inhibition (fold change) was determined by quantifying root elongation after 3 d of As(V) exposure, alone or with BSO, and comparing it with roots of plants grown at corresponding BSO concentrations without As(V). Root elongation was measured using ImageJ software.

Arsenic Quantification

For arsenic quantification experiments in Arabidopsis, plants were grown and treated using a method that accurately determines arsenic uptake kinetics and accumulation (Narang et al., 2000). Arabidopsis plants were grown on plates containing Johnson media solidified with 0.4% bacto-agar with 30 mM Pi and covered with 0.4 mm-pore nylon mesh. Seeds were sown onto the mesh and cultured for 7 d, after which plants were treated with PI and PII buffers (Narang et al., 2000). Arsenic accumulation experiments were performed in 50 mL pots using 5 mM As(V) for 24 h. Plants were dried (60°C, 3 d) prior to arsenic quantification.

To determine arsenic accumulation in tobacco plants were grown in hydroponic conditions (4 weeks), washed with deionized water, grown for another 2 d in Pi-deficient conditions, then exposed to As(V) in medium containing 0.1 mM CaCl_2 , 5 mM As(V), 5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, pH 5.75 (24 h). Plants were placed in ice-cold buffer [0.1 mM CaCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, pH 5.75] for 1 h. Shoot and root samples were harvested separately and dried (60°C, 3 d).

Arsenic species from Arabidopsis and tobacco samples were extracted with 1:1 methanol:water using an ultrasonic homogenizer SONOPULS HD 2200 (30%, 60 s). Extracts were centrifuged (5500g, 10 min) and supernatant filtered through a 22-mm nylon syringe before injection into the HPLC for arsenic speciation. Diluted samples were injected onto an anion-exchange column PRP-X100 (250 3.4.1 mm, particle size 10 μm; Hamilton, Reno, NV). Arsenic species

were eluted in 10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, 2% (v/v) MeOH mobile phase, at a 1.5 mL min⁻¹ flow rate. To test the efficiency of the method, three replicates of the extracts were digested individually with HNO_3 - H_2O_2 to compare total arsenic content (ICP-MS) with the concentration sum of all arsenic species (LC-ICP-MS) in the initial extracts. As(III) was quantified on an As(III) calibration curve; As(V) in the sample was used as an internal normalization standard.

Analytical quality control was used for total arsenic content and arsenic species were validated by analyzing certified reference material (ref. numbers

SRM 1568a; NIST and CRM-627; BCR, Belgium). Good agreement was found for both reference materials ($\pm 10\%$ uncertainty considering a 95% confidence level). For extraction recovery, samples were spiked with known amounts of distinct arsenic species, with recoveries of 80% to 100%.

Quantification of Biothiols

For biothiol quantification, *Arabidopsis* and tobacco plants were grown as described for arsenic quantification. An alkaline-reducing procedure was used to extract biothiols from *Arabidopsis* seedlings exposed to As(V) using the procedure described by LeBlanc et al. (2013) with minor modifications. Frozen samples (0.1 mg) were ground with 30 mL 50 mM N-acetyl Cys as an internal standard and homogenized with 270 mL reducing reagent (2 mg mL⁻¹ NaBH₄ in 0.1 M NaOH). The mixture was transferred to 1.5-mL Eppendorf tubes, acidified with 50 mL 10 M HCl, centrifuged (12,000g, 15 min, 4°C), and supernatant transferred to chromatographic vials under dim light for HPLC analysis.

For tobacco samples, we used an acidic extraction procedure (Sobrinho-Plata et al., 2014). Frozen root tissue (100 mg) was homogenized in 0.125 N HCl (270 mL) with 30 mL 50 mM N-acetyl-Cys as an internal standard. Homogenized samples were centrifuged (12,000g, 15 min, 4°C) and supernatant used for HPLC analysis.

Biothiol profiles were analyzed by HPLC (Sobrinho-Plata et al., 2009). Extracts (100 mL) were injected into a Mediterranean SEA18 column (250 x 4.6 mm; Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, Spain), using an Agilent Technologies 1200 series HPLC system (Santa Clara, CA). Thiols were detected after postcolumn derivatization with Ellman reagent and quantified against the N-acetyl Cys internal standard. Biothiols were identified by comparing retention times of peaks from each sample with those of commercially available standards; Cys and GSH were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and PC2, PC3 and PC4 from AnaSpec (Fremont, CA).

CK Quantification

For quantification of CKs, *Arabidopsis* seedlings were grown in Johnson medium (+Pi) for 7 d and transferred to Pi-lacking medium for 3 d to activate expression of the As(V)/Pi transporters. Pi-starved plants were then exposed to 30 mM As(V) in liquid medium (-Pi) for 6 h. Fresh samples were collected and frozen in liquid N₂. Frozen samples (250 mg) were ground in a mortar with liquid N₂ and homogenized with 4 mL precooled (220°C) methanol:water:formic acid (15:4:1, v/v/v). Deuterium-labeled CK internal standards ([²H]₂JZ, [²H]₂JZR, [²H]₂JiP, [²H]₂JiPR, [²H]₂BA, and [²H]₂JBAR; Olchemim Ltd, Olomouc, Czech Republic) were added (40 mL stock solution of 50 ng/mL of each standard in methanol) and extracted as described (Sudre et al., 2013). CKs were quantified using a High performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) system as described (Sudre et al., 2013). Significant differences ($P < 0.05$) among treatments were calculated using one-way ANOVA and the Least Significant Difference Fisher post hoc test. Statistical test were performed using the statistical package Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

Gene Expression Analysis by qRT-PCR

Gene expression analysis was performed with plants grown as for CK quantification. Quantitative real-time reverse transcription-PCR was performed on three independent biological samples as described (Aguilar-Martínez et al., 2007). RNA extracted with TRI Reagent (Sigma) was used for cDNA synthesis using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's instructions. cDNA was diluted ten times in water and qRT-PCR performed using SYBR Green reagent. Each sample was normalized using EF1a (for primer sequences, see Supplemental Table S2).

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Table S1. TOP65CytK genes that overlap with As(V)-down-regulated genes.

Supplemental Table S2. Primers used for qRT-PCR analysis.

Supplemental Figure S1. Phenotypes of *ipt 3 5 7*, wild-type (Col-0), *cyp735a1 a2*, *35S:CKX1*, and *ahk2 ahk3* plants grown on 12.5 mM Pi for 10 d.

Supplemental Figure S2. CK-responsive genes are down-regulated in response to As(V). qRT-PCR expression analysis of ARR9, AHK4, and CYP82F1 in Col-0.

Supplemental Figure S3. As(V) sensitivity to BSO increased preferentially in CK-depleted plants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carmen L. Torán for critical reading of the manuscript, Cristihan González and Yolanda Leo del Puerto for technical assistance, and Catherine Mark for editorial assistance.

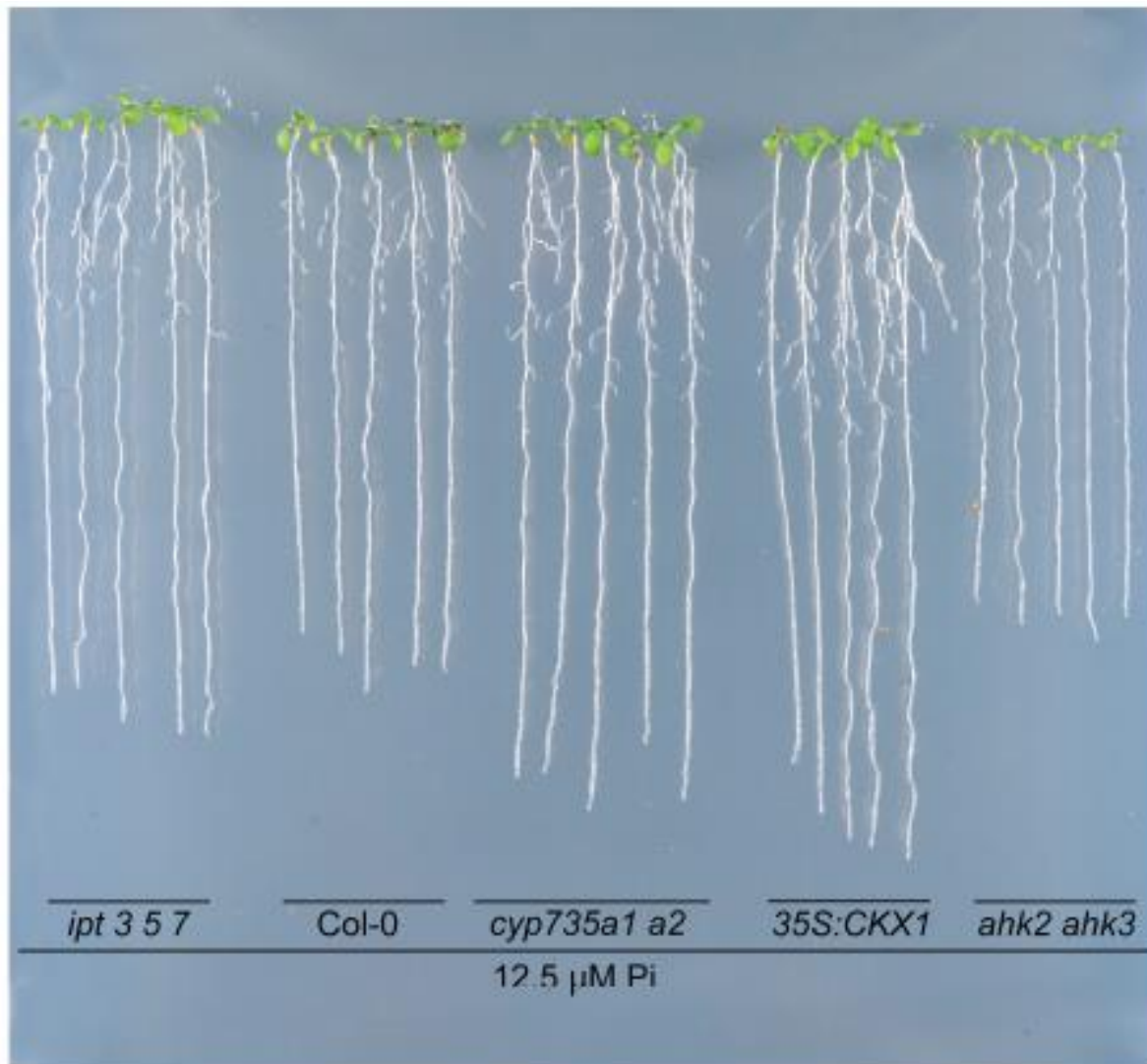
Received March 10, 2016; accepted April 12, 2016; published April 18, 2016.

LITERATURE CITED

- Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* 19: 458–472
- Bleeker PM, Hakvoort HW, Bliet M, Souer E, Schat H (2006) Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J* 45: 917–929
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmülling T (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* 44: 314–333
- Brenner WG, Schmülling T (2012) Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. *BMC Plant Biol* 12: 112
- Brenner WG, Schmülling T (2015) Summarizing and exploring data of a decade of cytokinin-related transcriptomics. *Front Plant Sci* 6: 29
- Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Te M, Mouriz A, Catarecha P, Sobrinho-Plata J, Olsson S, et al (2013) WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 2944–2957
- Chao D-Y, Chen Y, Chen J, Shi S, Chen Z, Wang C, Danku JM, Zhao F-J, Salt DE (2014) Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLoS Biol* 12: e1002009
- Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA, Meagher RB (2002) Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nat Biotechnol* 20: 1140–1145
- Dhankher OP, Rosen BP, McKinney EC, Meagher RB (2006) Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5413–5418
- Franco-Zorrilla JM, Martin AC, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 353–360
- Fu S-F, Chen P-Y, Nguyen QT, Huang L-Y, Zeng G-R, Huang T-L, Lin C-Y, Huang H-J (2014) Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 14: 94
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* 107: 1059–1066
- Jeon J, Kim J (2013) *Arabidopsis* response Regulator1 and *Arabidopsis* histidine phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling. *Plant Physiol* 161: 408–424
- Johnson CM, Stout PR, Broyer TC, Carlton AB (1957) Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil* 8: 337–353
- Kiba T, Takei K, Kojima M, Sakakibara H (2013) Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 27: 452–461

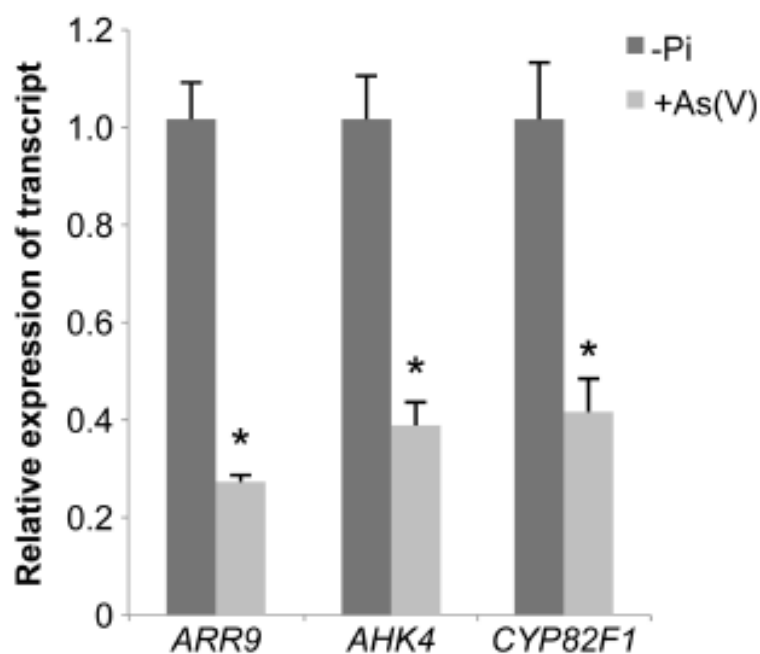
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635–638
- LeBlanc MS, McKinney EC, Meagher RB, Smith AP (2013) Hijacking membrane transporters for arsenic phytoextraction. *J Biotechnol* 163: 1–9
- Li CX, Feng SL, Shao Y, Jiang LN, Lu XY, Hou XL (2007) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *J Environ Sci (China)* 19: 725–732
- Martín AC, del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de La Peña A, Leyva A, Paz-Ares J (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 24: 559–567
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004) A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J* 38: 779–789
- Meharg AA, Macnair MR (1992) Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J Exp Bot* 43: 519–524
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16598–16603
- Narang RA, Bruene A, Altmann T (2000) Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol* 124: 1786–1799
- Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, Suk WA (2013) The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect* 121: 295–302
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, et al (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell* 23: 2169–2183
- Ortega-Villasante C, Rellán-Alvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* 56: 2239–2251
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 290–295
- Ramireddy E, Chang L, Schmölling T (2014) Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signal Behav* 9: e27771
- Reid R, Gridley K, Kawamata Y, Zhu Y (2013) Arsenite elicits anomalous sulfur starvation responses in barley. *Plant Physiol* 162: 401–409
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmölling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18: 40–54
- Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529: 86–92
- Sánchez-Bermejo E, Castrillo G, del Llano B, Navarro C, Zarco-Fernández S, Martínez-Herrera DJ, Leo-del Puerto Y, Muñoz R, Cámara C, Paz-Ares J, et al (2014) Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 5: 4617
- Schmöger ME, Oven M, Grill E (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol* 122: 793–801
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675
- Shri R, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallik S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, et al (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1102–1110
- Sobrinho-Plata J, Carrasco-Gil S, Abadía J, Escobar C, Álvarez-Fernández A, Hernández LE (2014) The role of glutathione in mercury tolerance resembles its function under cadmium stress in *Arabidopsis*. *Metal-Ionics* 6: 356–366
- Sobrinho-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, Escobar C, Del Campo FF, Hernández LE (2009) Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77: 946–954
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, et al (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 21187–21192
- Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'Souza SF (2009) Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *J Exp Bot* 60: 3419–3431
- Sudre D, Gutierrez-Carbonell E, Lattanzio G, Rellán-Alvarez R, Gaymard F, Wohlgenuth G, Fiehn O, Alvarez-Fernández A, Zamarreño AM, Bacaicoa E, et al (2013) Iron-dependent modifications of the flower transcriptome, proteome, metabolome, and hormonal content in an *Arabidopsis* ferritin mutant. *J Exp Bot* 64: 2665–2688
- Sung D-Y, Kim T-HH, Komives EA, Mendoza-Cózatl DG, Schroeder JI (2009) ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 802–813
- Tran L-S, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623–20628
- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJ (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* 25: 158–165
- Wang X, Yi K, Tao Y, Wang F, Wu Z, Jiang D, Chen X, Zhu L, Wu P (2006) Cytokinin represses phosphate-starvation response through increasing of intracellular phosphate level. *Plant Cell Environ* 29: 1924–1935
- Webb SM, Gaillard J-F, Ma LQ, Tu C (2003) XAS speciation of arsenic in a hyper-accumulating fern. *Environ Sci Technol* 37: 754–760
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmölling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532–2550
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, Schmölling T (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22: 3905–3920
- Yoon Y, Lee W-MM, An Y-JJ (2015) Phytotoxicity of arsenic compounds on crop plant seedlings. *Environ Sci Pollut Res Int* 22: 11047–11056
- Yu LJ, Luo YF, Liao B, Xie LJ, Chen L, Xiao S, Li JT, Hu SN, Shu WS (2012) Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* 195: 97–112
- Zhu Y-G, Rosen BP (2009) Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality? *Curr Opin Biotechnol* 20: 220–224
- Zwack PJ, Rashotte AM (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J Exp Bot* 66: 4863–4871

Supplemental Figure S1



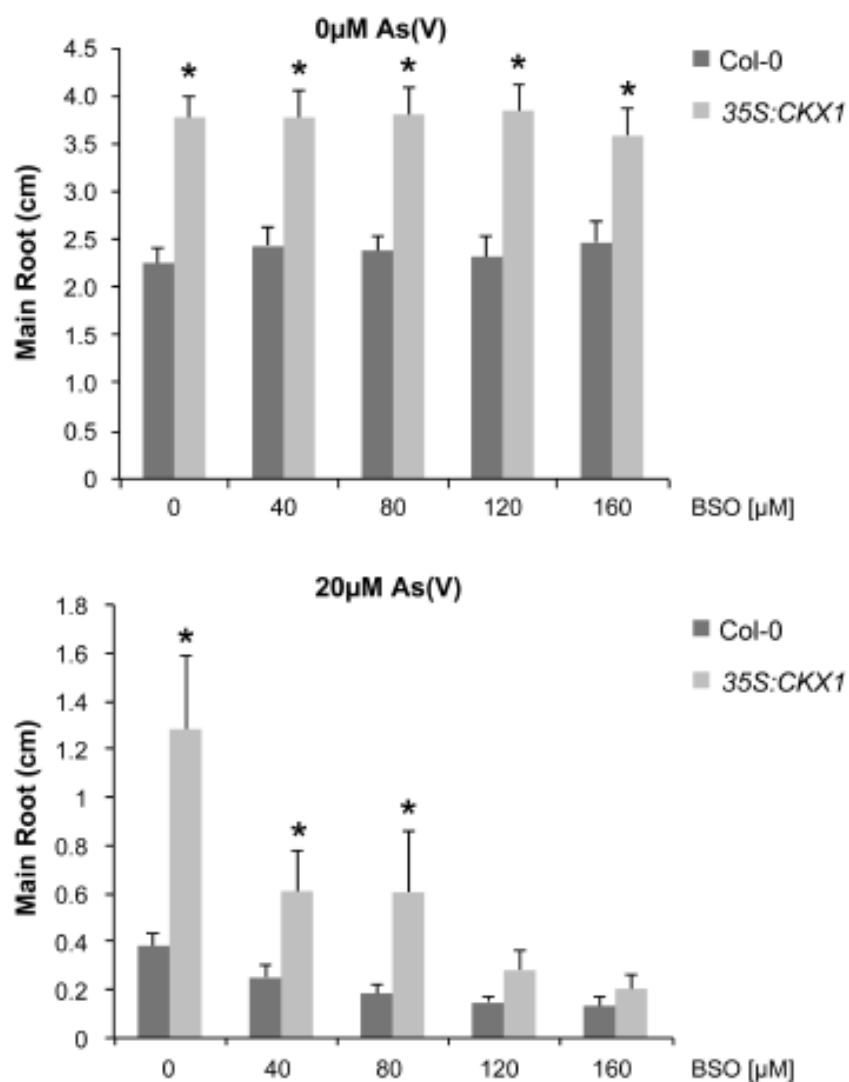
Supplemental Figure S1. Phenotypes of *ipt 3 5 7*, wild-type (Col-0), *cyp735a1 a2*, *35S:CKX1* and *ahk2 ahk3* plants grown on 12.5 μM Pi for 10 days.

Supplemental figure S2



Supplemental Figure S2. CK responsive genes are downregulated in response to As(V). qRT-PCR expression analysis of *ARR9*, *AHK4* and *CYP82F1* in Col-0. Plants were grown in +Pi medium for 7 d, transferred to -Pi medium for 3 d and then to -Pi liquid medium alone (-Pi) or with 30 μ M As(V) [+As(V)] for 6 h. Expression was analyzed in whole seedlings. Bars show mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

Supplemental figure S3



Supplemental Figure S3. As(V) sensitivity to BSO increased preferentially in cytokinin-depleted plants. Plants were grown on Johnson medium with 12.5 μM Pi in a vertical position for 5 d and then transferred to the same medium with increasing concentrations of BSO alone (top) or with 20 μM As(V) (bottom). Increase in root length was measured in wild-type (Col-0) and 35S:CKX1-overexpressing plants 3 d after transfer. Bars show mean ± SD ($n \geq 15$). * $P < 0.01$ (Student's t -test).

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Table S1. TOP65CytK genes that overlap with As(V)-downregulated genes. The data are supplementary to those shown in Table 1.

Downregulated after As(V) -1.5h		Downregulated after As(V) -8 h	
AGI	Protein encoded	AGI	Protein encoded
At1g31320	LOB domain-containing protein 4	At1g04250	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
At1g59940	response regulator 3	At1g10470	response regulator 4
At2g01830	CHASE domain containing histidine kinase protein	At1g13420	sulfotransferase 4B
At2g25160	cytochrome P450, family 82, subfamily F, polypeptide 1	At1g16530	ASYMMETRIC LEAVES 2-like 9
At2g34610	unknown	At1g17190	glutathione S-transferase tau 26
At2g40670	response regulator 16	At1g19050	response regulator 7
At3g44990	xyloglucan endo-transglycosylase-related 8	At1g31320	LOB domain-containing protein 4
At3g45700	Major facilitator superfamily protein	At1g59940	response regulator 3
At3g50300	HXXXD-type acyl-transferase family protein	At1g69040	ACT domain repeat 4
At3g57010	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily	At1g69530	expansin A1
At3g57040	response regulator 9	At1g72140	Major facilitator superfamily protein
At5g47950	HXXXD-type acyl-transferase family protein	At2g01830	CHASE domain containing histidine kinase protein
At5g60890	myb domain protein 34	At2g01890	purple acid phosphatase 8
At5g62920	response regulator 6	At2g25160	cytochrome P450, family 82, subfamily F, polypeptide 1
		At3g29250	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
		At3g44990	xyloglucan endo-transglycosylase-related 8
		At3g50300	HXXXD-type acyl-transferase family protein
		At3g57010	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
		At3g57040	response regulator 9
		At4g11190	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
		At4g19030	NOD26-like major intrinsic protein 1
		At4g23750	cytokinin response factor 2
		At4g29690	Alkaline-phosphatase-like family protein
		At4g29700	Alkaline-phosphatase-like family protein
		At5g05860	UDP-glucosyl transferase 76C2
		At5g26260	TRAF-like family protein
		At5g47950	HXXXD-type acyl-transferase family protein
		At5g47980	HXXXD-type acyl-transferase family protein
		At5g47990	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 5
		At5g48000	cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 2
		At5g48010	thalianol synthase 1
		At5g60890	myb domain protein 34

Supplemental Table S2. Primers used for qRT-PCR analysis

AGI	Genes	Forward	Reverse
AT1G18070	<i>EF1a</i>	cccaggctgattgtgctgt	gggtgggtggcatccatctgtt
AT5G43350	<i>PHT1;1</i>	cctcaactctccagagaagttctta	ttcgccatttcttagagc
AT4G23100	<i>γ-ECS</i>	ttccctgtctccctgggtg	tccaagtatcttcaaccgaac
AT5G27380	<i>GSH2</i>	cccgagcatagcttaccatt	gcaatgtcctctttgtgtcc
AT5G44070	<i>PCS1</i>	tcgatcctggagcgtaaatgg	ttcgagcaatccaacatt
AT2G21045	<i>AtARQ1</i>	ttgatcgtggctgtaacg	ttagccacatggctgtaacc
AT3G57040	<i>ARR9</i>	caaccgctgtctgatctacca	tctgcattccctactgaaacca
AT2G01830	<i>AHK4</i>	tacgctcaaaccgctcaagtat	tggtactgattccaactccagc
AT2G25160	<i>CYP82F1</i>	gtctatacccaccagtcctct	tcttccatgcactcaccatcaa
AT3G63110	<i>IPT3</i>	ccaagatggatgctaacgtg	cgacacagtatctgtgcttgg
AT5G19040	<i>IPT5</i>	agttacagcgtgaccacca	ggcagagatctccggtagg
AT3G23630	<i>IPT7</i>	actcctttgtctcaaacgtgtc	tgaacacttcttacttctcgagt
AT2G41510	<i>CKX1</i>	ctgagaagcggaattctgaac	gagtaccctgatccatttaacca
AT5G56970	<i>CKX3</i>	tctcaatacacagtcaacgagga	tcgtacataaacctcttcatg
AT4G29740	<i>CKX4</i>	ccctcccattattgaccag	cgaatacggaacatctgtacg
AT1G75450	<i>CKX5</i>	ccatggctctcaaattagtaacg	tctgagcatctcatcctctc
AT5G21482	<i>CKX7</i>	caccagagctagggtttgc	catcgaactcgggtgtatactctt

Supplemental Figure S1. Phenotypes of *ipt 3 5 7*, wild-type (Col-0), *cyp735a1 a2*, *35S:CKX1* and *ahk2 ahk3* plants grown on 12.5 μ M Pi for 10 days.

Supplemental Figure S2. CK-responsive genes are downregulated in response to As(V). qRT-PCR expression analysis of *ARR9*, *AHK4* and *CYP82F1* in Col-0. Plants were grown in +Pi medium for 7 d, transferred to -Pi medium for 3 d and then to -Pi liquid medium alone (-Pi) or with 30 μ M As(V) [+As(V)] for 6 h. Expression was analyzed in whole seedlings. Bars show mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

Supplemental Figure S3. As(V) sensitivity to BSO increased preferentially in cytokinin-depleted plants. Plants were grown on Johnson medium with 12.5 μ M Pi in a vertical position for 5 d and then transferred to the same medium with increasing concentrations of BSO alone (top) or with 20 μ M As(V) (bottom). Increase in root length was measured in wild-type (Col-0) and *35S:CKX1*-overexpressing plants 3 d after transfer. Bars show mean \pm SD ($n \geq 15$). * $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

ESTUDIOS DE BIOCONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS EN LARVAS DE PEZ CEBRA

Los efectos en el medio ambiente y en el ser humano de algunos metales han sido estudiados desde hace décadas. Adicionalmente, el empleo de nuevos materiales en multitud de aplicaciones, como las nanopartículas, está fomentando el estudio de los posibles efectos que estos nuevos materiales pueden provocar, ya que se trata de contaminantes emergentes. Una parte fundamental de estos estudios implica el uso de organismos "modelo" con propiedades muy definidas, que permiten entender o vaticinar los mecanismos de toxicidad relacionados con los contaminantes a los que estamos expuestos. En los trabajos presentados en esta tesis se han estudiado, como metales los elementos Cd, Hg, As y Ag, y, como nanopartículas los quantum dots (QDs)

El Test Oficial más empleado para obtener los Factores de Bioconcentración (BCF) en ensayos con peces adultos, es el Test 305 de la OECD, como ya se ha explicado en la introducción de esta tesis. En nuestro caso, los ensayos de bioconcentración han sido llevados a cabo utilizando un Test alternativo, propuesto en nuestro grupo de investigación, en el que no es necesario llegar a estado adulto para calcular los BCF, disminuyendo así considerablemente los costes y el tiempo de ensayo.

Los estudios se realizaron de acuerdo con el Comité de ética animal (AEC), empleando larvas de pez cebra (eleuteroembriones). Para cada experimento, los embriones se dejaron crecer 72h hasta llegar al estado de eleuteroembriones, utilizando aproximadamente 500 individuos para cada ensayo. La incubación con el agente contaminante se llevó a cabo teniendo en cuenta el LC₅₀ de cada uno, en un intervalo entre el 0.1-1% del mismo, tal y como indica el Test 305. El procedimiento de exposición consta de dos etapas: en primer lugar, se produce la absorción del contaminante durante 48 h y en segundo lugar, se retira del medio el contaminante para que tenga lugar el proceso de depuración durante 24 h. Es importante controlar la concentración del contaminante en el medio para garantizar un valor constante durante todo el experimento ($\pm 10\%$, según el Test 305).

El estudio de distribución de los metales y QDs se realizó mediante la técnica de LA-ICP-MS. Esta técnica nos permite visualizar los elementos una vez son absorbidos por el organismo. De este modo, han podido ser localizados en el interior de las larvas de pez cebra.

En el primer trabajo titulado "*Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae*", se compara la bioconcentración del cadmio iónico, o como nanopartículas (QDs). El estudio con QDs necesita una caracterización previa de estas NPs para entender su comportamiento, fundamentalmente, la posibilidad de agregarse o de "romperse" liberando así los iones que conforman su núcleo.

El cálculo de los BCFs determinó que cuando el cadmio se añadía como cadmio iónico se producía una bioconcentración significativa; por el contrario, los QDs no mostraron valores mayores a la unidad, indicando que no se produce absorción de los mismos. Aunque el fenómeno de absorción del Cd no tiene lugar cuando la exposición se realiza con los QDs, es importante tener en cuenta los procesos de degradación de estas NPs, ya que suponen un incremento del Cd libre en un 2%. Sin embargo, estos datos se verificaron con las imágenes obtenidas por LA-ICP/MS, observando claras diferencias entre ambos. El cadmio libre se acumula en los ojos y los QDs se quedan en la superficie, no penetrando al interior de las larvas.

En el segundo trabajo "*Bioaccumulation of methylmercury, cadmium, silver and arsenic from exposure to mixtures in zebrafish (Danio rerio) eleutheroembryos*", el principal objetivo fue la comparación de la bioconcentración observada mediante el cálculo de los BCFs, cuando las larvas están expuestas a una mezcla de metales con los BCF's observados cuando son expuestos individualmente. Esta exposición conjunta puede potenciar o inhibir la capacidad de bioacumulación de cada uno de ellos por separado. Los elementos elegidos han sido estudiados previamente en nuestro grupo, de este modo, los BCFs individuales obtenidos en ensayos anteriores se pudieron comparar con los obtenidos en este trabajo.

Una vez más, los datos de bioconcentración fueron reforzados tras el análisis de las imágenes por LA-ICP/MS. No sólo se vieron diferencias en los niveles de bioacumulación cuando las larvas son expuestas a la mezcla de metales, sino que además, para cada elemento se pudieron diferenciar distintas zonas de acumulación, destacando la bioacumulación del cadmio en los ojos, y del metilmercurio en el aparato digestivo.

**Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide
quantum dots in zebrafish larvae
(Chemosphere, 2016)**

Los resultados de este trabajo fueron presentados como póster en las
“14as Jornadas de análisis instrumental (JAIs)” celebrada en Barcelona del
1-3 Octubre del 2014

Los resultados de este trabajo fueron presentados como poster y
comunicación flahs en el “VII Workshop en Nanociencia y
Nanotecnologías Analíticas (NYNA)”, celebrado en Salamanca el 6-8 Julio
2015



Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae



S. Zarco-Fernández^{a,1}, A.M. Coto-García^{a,1}, R. Muñoz-Olivas^{a,*}, J. Sanz-Landaluze^a, S. Rainieri^b, C. Cámara^{a,**}

^a Dpto. Química Analítica, Facultad CC. Químicas, Universidad Complutense, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid, Spain

^b Food Research Division, AZTI-Tecnalia, 23 Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea 609, 24, 48160 Derio, Spain

HIGHLIGHTS

- Wide characterization and properties definition of quantum dots.
- Monitoring of exposition conditions all throughout the bioconcentration experiment.
- Shorter and cheaper protocol for bioconcentration using zebrafish larvae instead adult fishes.
- Comparison of BCFs of ionic Cd and quantum dots.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2015

Received in revised form

26 October 2015

Accepted 21 December 2015

Available online 25 January 2016

Handling Editor: Martine Leermakers

Keywords:

Quantum dots

Cadmium

Bioconcentration factor

Zebrafish larvae

Laser ablation

ABSTRACT

The concern related to the use of nanomaterials is growing nowadays, especially the risk associated with their emission or exposure. One type of nanomaterials that has attracted much attention is quantum dots (QDs). QDs incorporation in consumer goods increases the probability of their entering in the environment and then into living organisms and human. In order to evaluate their potential to be bioconcentrated, zebrafish larvae have been exposed to SeCd/ZnS QDs, after performing an exhaustive characterization of these nanoparticles under the assay conditions. These data were compared with those obtained when zebrafish larvae were exposed to ionic cadmium. Finally, distribution of ionic Cd and QDs in exposed zebrafish larvae have been evaluated by Laser Ablation ICP-MS.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium is a biologically non-essential metal and usually toxic at very low concentrations. It is considered as a class I carcinogen by the International Agency of Research on Cancer (IARC, 1993). The main sources of cadmium in the environment are industrial processes, urban traffic, waste incinerators, solid waste such as plastics and batteries or as a contaminant of phosphate fertilizers (Choong et al., 2014). Its presence in the environment could be a serious

issue, which could be aggravated owing to its accumulation in the food chain. Nanomaterials are present in the environment since several centuries (Petosa et al., 2010; Reibold et al., 2006), although their growing production due to their advantageous properties will conduce to an increase of their levels in the environment either in areas of production and in consumer goods. One type of nanomaterials which have attracted much attention in the last years is Quantum Dots (QDs). QDs are colloidal nanostructured materials composed by elements from the periodic groups II–VI, III–V, IV–VI, and within this group CdSe QDs are the most widely studied. Their special optical properties such as wide absorption band that allows multiple color QDs excitation with a unique source of light have favored their use as labels in bioanalysis. Some electronic applications, security inks or Light Emitting Diodes (LED), are under investigation but they have already demonstrated their great

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: rimunoz@ucm.es (R. Muñoz-Olivas), ccamara@ucm.es (C. Cámara).

¹ First and second authors contribute equally.

potential.

Their potential risk could be caused by the nanomaterial itself or by their free metallic components. Thus, the assessment of nanoparticles risk compared to their dissolved components is an area of interest, being rather complicated as each kind of nanoparticle has unique composition (core and ligands), and besides the possible degradation products generated will depend on the final application given to the nanomaterial. Nowadays, the European Union is limiting the use of cadmium and other metals in plastics or coatings (European Chemicals Agency, 2013). In general, adult fishes or mammalian models such as mice or rats are usually employed to evaluate *in vivo* effects of contaminants, but these studies are time consuming, present ethical issues and are expensive (Yong et al., 2013). The use of zebrafish larvae appears as an alternative model, since it represents the dynamic that occur *in vivo* in a complex organism (Dai et al., 2014; Kim, 2013).

In this work we present the results got in a bioconcentration assay based on the use of zebrafish larvae as an alternative to Test OECD 305, the official assay employed to test chemicals in adult fish to calculate the Bioconcentration Factors (BCF) (OECD, 2012). Previous papers by employing this alternative have demonstrated to be comparable with those obtained using OECD 305 guideline (Sanz-Landaluze et al., 2015). It implies a considerable reduction in exposure time to the chemical (from 28 days to 48–72 h), as well as the required amount of compounds under evaluation (Kim, 2013). Nevertheless, the determination of chemical concentration in larvae is a challenge since it requires highly sensitive analytical techniques owing to low sample amount (1 larvae ~ 0.44 mg). Zebrafish larvae were exposed following OECD 305 guidelines to CdSe/ZnS QDs and to ionic cadmium with the thought the potential event of Cd release from QDs, that is, considering the nanoparticles as a source of ionic cadmium (Liu et al., 2012). Prior to the bioconcentration study, it was necessary to perform an exhaustive nanomaterial characterization in the presence of larvae in order to provide as much information as possible about the evaluated nanoparticles either in the stock solution or in zebrafish exposure media.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Analytical grade chemicals were used for all experiments. Ionic cadmium solution (1000 mg L^{-1} Cd, Fluka) was used to prepare the standard solutions to do daily calibrations. Sub boiled nitric acid (HNO_3 60% Scharlau, Barcelona, Spain), and hydrogen peroxide (H_2O_2 35%) were used to digest nanoparticles. Larvae exposure solution (ISO water) of similar composition to fresh river water was prepared as follows: 294 mg of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 123.3 mg of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 63 mg of NaHCO_3 and 5.5 mg of KCl were diluted to 1 L in distilled water. Milli-Q Element ultrapure water (Millipore, Billerica, MA, USA) was employed for all reagent and standards dilutions.

Commercial QDs were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). The first type QDs-C, (CdSe/ZnS alloyed quantum dots –COOH functionalized $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in water) was employed as received without further modifications. The second type QDs-P, (Lumidot CdSe/ZnS core–shell type quantum dots, 5 mg L^{-1} in Toluene) were prepared following a reported procedure in order to make them compatible in aqueous media (Fernandez-Arguelles et al., 2007). In both cases, QDs concentration, as stated by the manufacturer, was 1000 mg L^{-1} without further specifications. They were stored in the dark at 4°C until use. QDs suspensions with ISO water were prepared at the desired concentration through the corresponding dilutions for the bioconcentration experiments.

2.2. Instrumentation

Cadmium extraction from larvae: A Vibra cell VCx130 focused ultrasonic probe (USP) (Connecticut, USA) equipped with a 3 mm diameter titanium microtip and fitted with a high frequency generator of 130 W at a frequency of 20 KHz was used for sample treatment. A centrifuge model FVL-2400 N from Combi-Spin (Boeco, Germany) was used for sample centrifugation.

Ultrafiltration: Ionic components released from QDs degradation can be evaluated by ultrafiltration using appropriate centrifugal filters (10 KDa, Amicon, Millipore). Three aliquots of exposure solution were filtrated, centrifuged, and measured by ICP-MS.

Fluorescence measurements: Fluorescence spectra from the QDs exposure solutions were recorded using a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) luminescence spectrophotometer equipped with a Xenon discharge lamp using a fixed excitation wavelength of 480 nm. All measurements were carried out using conventional 1 cm quartz luminescence cuvettes (Hellma, Germany). Quantum Yields (QY) were measured according to a comparative method (Lackowicz, 2006), employing a well characterized standard sample with a known fluorescence QY value (Rhodamine 6G 95% in ethanol).

UV–Vis Detector: QDs core diameter was estimated by UV–Vis spectrophotometry (Hewlett Packard 8453) according to Pens's equation (Yu et al., 2003) based on calculations from absorbance and fluorescence data. Also making use of this empirical equation the concentration of nanoparticles (molar concentration) in solution was estimated applying Lambert–Beer Law.

Dynamic Light Scattering (DLS): Measurement of hydrodynamic diameters of nanoparticles were performed using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, United Kingdom) equipped with a 633 nm laser filter. Hydrodynamic diameter measurements were carried out in zebrafish media at QDs concentration of 3 mg L^{-1} Cd ($0.125 \text{ } \mu\text{M}$ Cd).

Transmission Electron Microscopy (TEM): TEM images were obtained on a JEOL JEM 2100 (Tokio, Japan) equipped with a micro analysis system coupled with Energy Dispersive X-ray analyzer (EDXS). Samples were prepared by placing several drops of QDs solutions onto a copper TEM grid and then allowed to air-dry.

Inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS): ICP-MS HP-7700 Plus (Agilent Technologies, Analytical System, Tokyo, Japan) was employed to determine cadmium content. Ions monitoring at m/z ^{111}Cd , ^{114}Cd , and ^{115}In as internal standard, were selected for data collection. Experimental parameters have been summarized in Table S1a (Supporting Information).

Laser ablation coupled to ICP-MS (LA/ICP-MS): Spatial distribution on was performed by elemental mapping of cadmium in zebrafish larvae, using a KGW-Yb crystal infrared femtosecond laser (ALFAMET, Novalase Sa, Amplitude Systemes, France) coupled to ICP-MS (Perkin Elmer Sciex ELAN 6100). The frozen zebrafish larvae were placed over a polycarbonate plate previously covered with a thin gold layer to be employed as internal standard. ^{111}Cd , ^{112}Cd , ^{197}Au and ^{13}C isotopes were monitored. Data obtained were exported for further treatment for imaging processing using PAMAL (Plateforme d'Analyse des Métaux traces par Ablation Laser) (Sarrat et al., 2011; Gholap et al., 2010; Barst et al., 2011). Experimental parameters have been summarized in Table S1b (Supporting Information).

2.3. Zebrafish larvae exposure

Zebrafish larvae were obtained from wild type adult zebrafish bred and maintained in AZTI Zebrafish Facility (EU-10-BI) under standard conditions. All the experimental procedures were approved by the Regional Animal Ethics Committee. The OECD

technical guidance (OECD, 2012) was used as reference to establish the experimental conditions for larvae growing as well as the nominal concentrations for the contaminant exposure (1% and 0.1% of the compound LC₅₀ value). Also the OECD test established a loading rate of larvae between 0.7 and 0.8 g L⁻¹ and mortality lower than 20%. LC₅₀ values were selected according to the information found in the literature (18.8 µM; 2.1 mg L⁻¹) for ionic cadmium (Matz et al., 2007; METI-NITE, 2006), selecting three test concentrations: 2 µg L⁻¹, 10 µg L⁻¹, 50 µg L⁻¹. On the contrary, information on LC₅₀ for QDs is very limited, being to our knowledge only a publication which established a LC₅₀ value of 4.7 mg L⁻¹ (King-Heiden et al., 2009) stated as total cadmium per unit volume QD solution. Considering this value and the OECD recommendations, our assays have been performed at 500 and 1000 µg L⁻¹ Cd.

An approximate number of 500 larvae (72 h post-fertilization) were transferred to tanks filled with ISO water spiked with the selected concentration of ionic cadmium or QDs. Exposure consisted of two phases: a) absorption: from 0 h to 48 h of exposure in the contaminated media; and b) depuration: additional 24 h of exposure in clean ISO water. About 15 larvae were taken from the tank at different time intervals along absorption or depuration. QDs exposure was carried out under constant stirring to ensure homogeneous nanoparticles distribution in the solution. Together with larvae sampling, 5 mL of exposure solution were taken to monitor the concentration of the target analyte in the exposure media. Each group of larvae was washed with ultrapure water three times before freezing.

2.4. Determination of cadmium

Cd was the element present in QDs selected to be measured by ICP-MS due to its better instrumental response by considering the other elements present, Se and Zn; also, because presence of these two elements in larvae could be expected due to their essential character contrarily to cadmium.

Exposure medium: Determination of cadmium content in exposure solutions was carried out by a flow injection (FI) system coupled to the ICP-MS using 2% (v/v) HNO₃ as carrier solution. QDs needed a previous digestion using nitric acid (1:1) to destroy the nanoparticle and get ionic Cd.

Larvae: Cd was leached by treating larvae with a USP in 2% HNO₃ for 3 min at 40% amplitude in pulse mode (as recommended by the manufacturer); then a centrifugation step to precipitate lipids was applied. The supernatant was diluted and the total cadmium concentration was determined by ICP-MS. The reported Cd concentration in each larva is calculated considering an average zebrafish larvae wet weight of 0.44 mg (Shi et al., 2009).

Quality assurance included controls, replicate analyses, spiked recoveries (as no reference material with similar matrix was found) and calibrations. Analysis was carried out by triplicate. The limits of detection obtained for the whole method of larvae analysis (MDLs) were 10 ng g⁻¹ for QDs, and 30 ng g⁻¹ for ionic cadmium, whereas MDLs for exposure solution were 1 µg L⁻¹ for QDs and 0.5 µg L⁻¹ for ionic cadmium.

2.5. Calculation of bioconcentration factor (BCF)

The BCF factor is defined by the OECD as the ratio between the concentration of a compound in an organism and in the exposure media, once the equilibrium is reached (OECD, 2012). BCF has been calculated employing two different approaches, a) the ratio between the concentration of the compound at the maximum exposure time and the average in the exposure media or b) calculated from a first order model if the steady state is not reached. Both have been described elsewhere (Sanz-Landaluze et al., 2015).

3. Results and discussion

3.1. QDs characterization

Bioconcentration and toxicity of any nanomaterial depend on its composition, size and surface chemistry, parameters that need to be carefully characterized before carrying out any experiment. Apart from the core composition, the unique specific details about the commercial QDs are their diameter, fluorescence emission and concentration. The stated nanoparticles concentration is frequently a problem, since different studies express nanoparticles concentration employing inconsistent units or not paying special attention to this parameter. However, to facilitate comparison between research conclusions, it is preferable to assess QDs elemental composition (Tsoi et al., 2013). Thus, we employed ICP-MS to establish the elemental QDs concentration (Table S2, Supporting). Concerning core diameter, the value provided by the manufacturer was 6 nm for both types of QDs employed that has been confirmed by TEM analysis (Figure S1, Supporting). The micrographs revealed that both types of QDs are uniform in size and are not aggregated. Additionally, the spectrophotometric estimation according to Peng's equation (Yu et al., 2003) gave us an estimated diameter value of 5 nm. Regarding fluorescence emission, QDs-P maintains their fluorescence emission (620 nm) after their manipulation, whereas QDs-C showed a fluorescence emission centered at 625 nm (QY~0.5). Moreover, DLS analysis showed that QDs-P had a hydrodynamic diameter of approximately 30 nm, since polymeric coating also contributes to the nanoparticles size in water. Finally, ultrafiltration experiments were performed to evaluate the presence of the corresponding ionic Cd from the synthesis process or the potential nanoparticles degradation into their free metallic components, resulting negligible values: about 2%, this is, 10 µg L⁻¹, indicating high stability at these conditions.

3.2. QDs stability in the exposure medium

There are a wide number of *in vivo* studies which evaluates the potential toxicity of QDs (Bouldin et al., 2008; Galeone et al., 2012; Jackson et al., 2012; King-Heiden et al., 2009; Lewinski et al., 2010; Pace et al., 2010; Zhang et al., 2012a, 2012b), but the majority do not fulfill the requirements of official tests. In this work the evolution of QDs concentration in the exposure medium along the uptake phase was monitored as we considered essential to take into account the nanoparticles behavior to provide reliable data (Harper et al., 2011).

For that purpose, 200 µg L⁻¹ QDs-C and QDs-P dispersions were prepared in the exposure medium, and analyzed by UV-Vis and fluorescence spectrometry. Both provided similar UV and fluorescence spectra. However, the QY values, 0.4 and 0.1 for QDs-P and QDs-C respectively, were lower than QD stock solutions (0.5) likely due to QDs agglomeration. TEM microscopy was employed to confirm this thought. QDs-C remained agglomerated from t₀ (Fig. 1a) despite of fulfilling company specifications "QDs-C are stable in any buffered saline solution with an ionic strength of 160 mM or less in a pH range of 6–9". This observation was confirmed by DLS analysis: the dynamic diameter moves from 60 nm to 160 nm (Figure S2, Supporting). Concerning QDs-P, the micrographs showed less agglomeration and only after 72 h (Fig. 1b). Also, monitoring QDs concentration over time (measured as Cd) and due to agglomeration, QDs tend to deposit to the bottom, leading us to incorporate a moderate mechanic stirring that ensured homogeneous nano-agglomerates in solution. QDs-P was then selected to carry out the bioaccumulation assay.

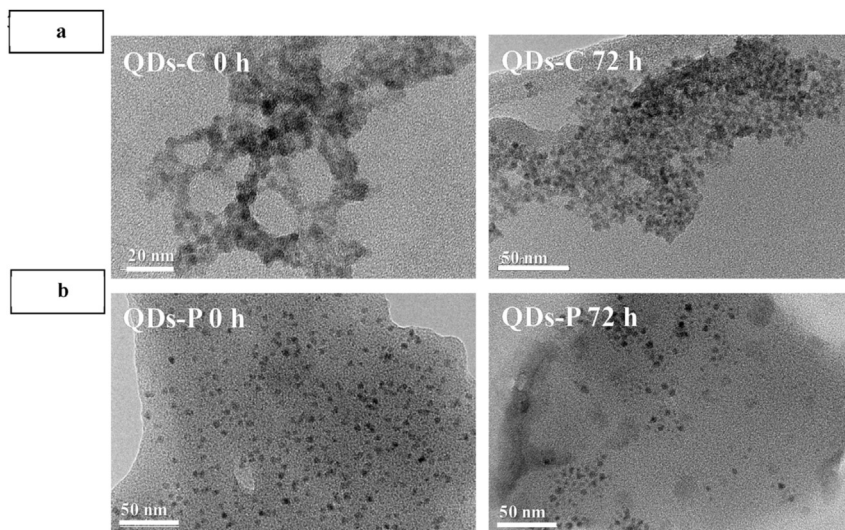


Fig. 1. TEM micrographs of QDs in larvae exposure media. 1a) QDs-C; 1b) QDs-P.

3.3. Monitoring Cd concentration during the bioconcentration tests

These tests must fulfill the OECD requirement that the variation of the nominal exposure concentration of the target analytes be within 20% during the whole experiment. Exposition to ionic Cd gave values of 2.2 ± 0.1 , 13 ± 1 , and $53 \pm 12 \mu\text{g L}^{-1}$ for the exposition to 2, 10 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The concentration measured for QDs was $420 \pm 30 \mu\text{g L}^{-1}$ for a nominal Cd concentration $500 \mu\text{g L}^{-1}$. We can state that OECD requirement have been accomplished.

3.4. QDs uptake by zebrafish larvae

Two QDs exposure tests were performed, considering 500 and $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ as Cd concentration. However, in the second case larvae died after 9 h of exposition. A similar effect was already reported (George et al., 2011) by using chalcogenide QDs with zebrafish embryos. Moreover for *Daphnia magna* it was observed the adhesion of QDs to the shell that should fatally affect (Feswick et al., 2013). The high level of nanoparticles concentration tested could increase the toxic effect due to the generation of more radical species. QDs as many nanoparticles could act as catalyst or energy donors in the generation of reactive oxygen species (Valledor et al., 2011; Fu et al., 2014) increasing their potential damage (Kim et al., 2010; Li et al., 2014). Then several factors could contribute to the mortality observed. The bioconcentration test at $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ is shown in Fig. 2 with a maximum concentration of 192 ng Cd g^{-1} . This value is rather low meaning there is not accumulation in the larvae at the conditions and concentration tested.

3.5. Ionic cadmium uptake by zebrafish larvae

Exposure to ionic Cd was evaluated at three levels of concentration according to LC_{50} values found in the literature and justified in the introduction. Bioconcentration profiles have been represented in Fig. 3. It seems that the uptake increased rapidly with exposure time in all cases until reaching the maximum at 100, 400 and 1100 ngCd.g^{-1} (wet weight) at 2, 10 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ exposition levels, respectively. In all cases the steady state was reached during the absorption phase, and during the depuration phase a slow decrease was observed, meaning only moderate depuration capacity by larvae.

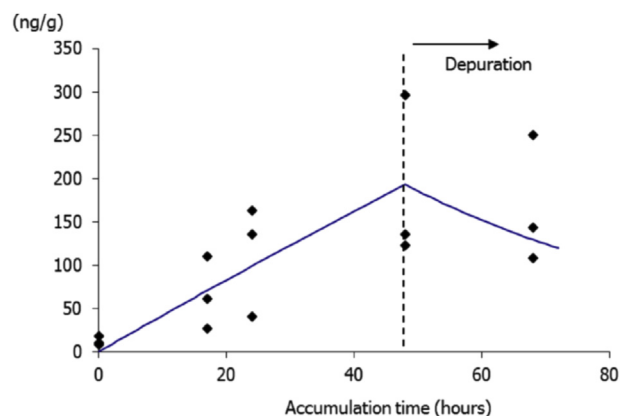


Fig. 2. Profile of QDs bioaccumulation in larvae. Cd nominal concentration: $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Diamond (◆) represent the experimental points and the curve indicates the expected values based on model calculations.

3.6. Comparison of BCF values obtained for ionic Cd and QDs

Toxicokinetic parameters both for ionic cadmium and QDs have been summarized in Table 1. The BCF is much higher for ionic Cd than for QDs, at any concentration tested. There is an inverse relationship between BCF and the nominal Cd exposure concentration which is in good agreement with previous results reported for other analytes (Cuello et al., 2012; McGeer et al., 2003). In another vein, if we compare $\text{BCF}_{48\text{h}}$ with BCF_K related to each ionic Cd concentration, the latest which is calculated via two-compartment model is higher in the three experiments. This remark is in good agreement with the values reported in the METI-NITE data base (METI-NITE, 2006). In addition, as mentioned above, larvae did not significantly reduce their cadmium body burden along depuration step that lasted 24 h for any of the ionic cadmium concentration tested. The slow elimination rate suggest that the absorbed cadmium is highly bound to tissues and the accumulation occurs in a dose-dependent manner (Matz et al., 2007).

Concerning QDs, a value as low as 0.5 for BCF_{48} was obtained. This fact has been attributed to a progressive increase of aggregates formation as it has already been stated. Those aggregates would not enter and led stuck to the surface of larvae. The negative charge of

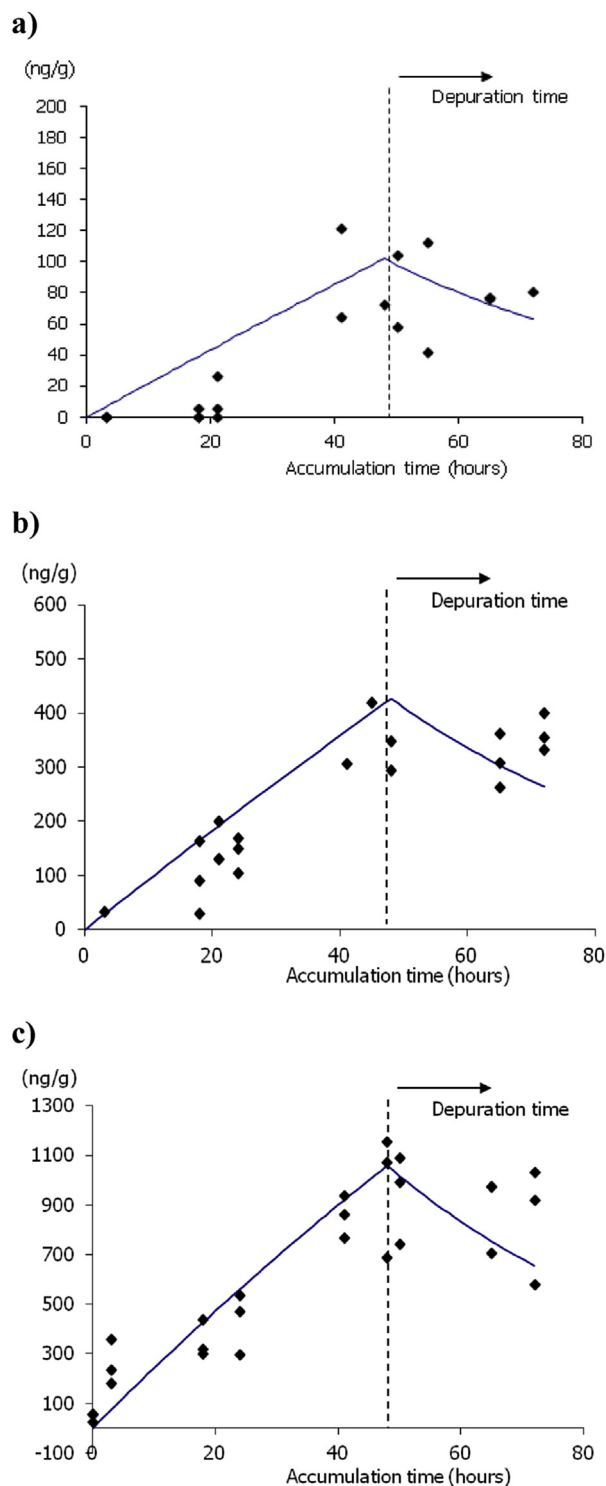


Fig. 3. Profile of ionic Cd bioaccumulation in larvae Cd nominal concentration a) $2 \mu\text{g L}^{-1}$; b) $10 \mu\text{g L}^{-1}$; c) $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Diamonds (\blacklozenge) represent the experimental points and the curve indicates the expected values based on model calculations.

the QDs could also be an obstacle for their uptake by larvae. Other similar studies (King Heiden et al., 2009; Wicinski et al., 2013) have reported extremely low accumulation values of cadmium in good agreement to our findings. This fact could also indicate that there is a limited amount of nanoparticles that can be assimilated by zebrafish larvae independently of QDs concentration or surface

ligands. In fact, those authors found that for three different coatings (CdSe_{core}/ZnS_{shell} QDs methoxy-terminated PEG₃₅₀-thiol (PEG₃₅₀-OCH₃), PEG₅₀₀₀-thiol terminated with carboxylate, PEG₅₀₀₀-COO⁻, and thiol terminated with methoxy, PEG₅₀₀₀-OCH₃) the release of ionic Cd was rather low (<5% of total Cd) under experimental conditions. However, CdSe core/ZnS shell-functionalized with poly-L-lysine (PLL) and CdSe core/ZnS shell-PEG₅₀₀₀-NH₂ QDs released 19 and 14% of their total Cd, suggesting a moderate degree of degradation under experimental conditions.

It must also be taken into account that the exposure route to the aquatic organism has an important effect on the uptake process. As an example, at similar level of QDs exposure some authors reported Cd body burden values for the marine amphipod *Leptocheirus plumulosus* as high as $600 \mu\text{g g}^{-1}$ (Jackson et al., 2012). In this case organisms were exposed to QDs in aqueous solution, but also to algae previously enriched in QDs. On the other hand, we have also calculated the different toxicokinetics parameters considering the amount of free cadmium present in the exposure media that accounted for the 2% of the nominal concentration, that is, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. With this approach, the uptake (k_1) and elimination (k_2) constants are totally comparable to those reported for ionic cadmium, as well as BCFs. There is an experiment performed with mussels that compared cadmium accumulation for CdTe QDs and ionic cadmium, keeping constant the concentration of cadmium (Rocha et al., 2014). It exhibited lower accumulation of QDs than ionic Cd indicating higher bioavailability of the later. In addition, mussels exposed to ionic cadmium accumulated Cd linearly with time, while those exposed to QDs only showed an increase in cadmium concentration at the beginning of the exposure. On the contrary, another similar work (Peyrot et al., 2009) reported the same level of cadmium accumulation for QDs than for ionic cadmium in the same animal model. The explanation given by the authors was that QDs were not stable in solution (14% of total cadmium was present in the dissolved fraction), thus the accumulation was due to the dissolved Cd. Dietary exposure has demonstrated higher Cd accumulation for ionic cadmium than for QDs in the intestinal tissue and liver (Blickley et al., 2014). A comparative evaluation of QDs bioaccumulation versus cadmium salts was performed by Contreras et al. in worms *Caenorhabditis elegans* exposed to 300 mg L^{-1} of QDs (as Cd). Worms showed accumulation values from 38.5 to 67.5 ng per worm (Contreras et al., 2013). These values are higher compared to our results, but it must be considered that the QDs were incorporated through ingestion and that the level of exposure was much higher. Finally, similar levels of accumulation were achieved in *Sparus aurata* intestine after 24 h of exposure to $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of ionic cadmium (Souid et al., 2013).

As we can see, results depend much on the experimental conditions under the study is carried out, *via* input to the organism, the organism itself, especially in the case of nanoparticles. This bioaccumulation assay could help to establish a general protocol to evaluate the potential impact of the nanoparticles in the environment. The selection of cadmium as the connecting element between the same types of nanoparticles could help to systematize the study of chalcogenide quantum dots, reporting at the same time as many as possible information about the studied nanomaterial.

3.7. Cd distribution in larvae

Zebrafish larvae exposed to QDs-P were analyzed by LA/ICP-MS trying to locate the nanoparticles in the larvae and to get more information about the bioaccumulation pathways (Gholap et al., 2010; Konz et al., 2012). Fig. 4 shows the elemental map/spatial distribution of Cd in two different larvae: (4a) exposed to QDs; (4b) exposed to ionic cadmium. Clear differences between the larvae

Table 1Toxicokinetic parameters and bioconcentration factors (BCF_{48h} , BCF_k) obtained from the adjustments of the experimental data.

	Ionic cadmium			Quantum dots	
Cd nominal concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2	10	50	500	10 ^a
C_w ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.2 ± 0.1	13 ± 1	53 ± 12	420 ± 30	8 ± 1
C_f (ng g^{-1})	102	427	1059	192	232
k_1 ($\text{L Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	1	0.7	0.5	0.01	0.6
k_2 (h^{-1})	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002
BCF_{48h}	46	32	20	0.5	28
BCF_k	666	350	94	5	300
BCF (METI-NITE, 2006)	620	310	115	—	—

C_w is the concentration of the chemical in the exposure media; C_f is the concentration in fish; k_1 is the first-order uptake constant; and k_2 is the first order elimination rate constant.

^a This concentration is referred to free Cd measured in the QDs exposure solution.

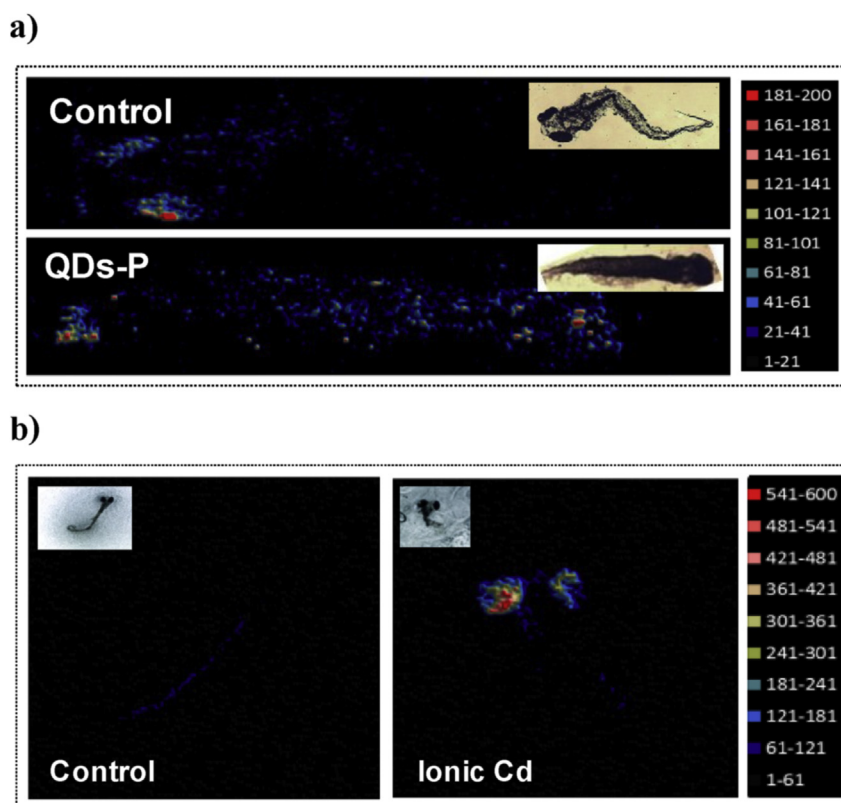


Fig. 4. Distribution of Cd along the larvae. 4a) QDs-P; 4b) Ionic Cd. Measured by LA/ICP-MS (Experimental conditions of Table 1).

control and exposed larvae are observed. In larvae exposed to ionic cadmium, the metal is located mainly in the eyes area whereas for the larvae incubated with QDs the cadmium seem to be more homogeneous distributed along the larvae surface. These results suggest that QDs are not assimilated in the organism (Jackson et al., 2012) and the analyzed cadmium could correspond to the fraction of ionic cadmium present in the solution, but in this case it would be localized in the eyes region. Another reliable possibility could be that the measured cadmium corresponded to an adsorption more than absorption process of nanoparticles over the zebrafish larvae peel. Some authors (Soenen et al., 2011) have proposed different mechanisms of degradation of quantum dots inside cells due to the acidic pH in vacuoles and lysosomes that could favor the covering degradation and the ions liberation into the cell but in our case, we cannot adventure a similar statement.

4. Conclusions

As major conclusions of this work can be highlight that nanoparticles tend to aggregate in presence of zebrafish larvae even taking the precaution of softly stirring the exposure solution. BCF values obtained suggest that the bioaccumulation potential of QDs is lower than ionic cadmium, as it was also confirmed through LA/ICP-MS analysis. QDs released to the aquatic environment could slowly deteriorate as have been signaled by other authors generating finally different cadmium species, but this degradation is very much depending on the coating. The assessment of nanoparticles bioaccumulation through the content of their metal constituents could be a reliable and simple alternative when this data are clearly observed. Despite the applications and routes inside organisms differ among species, the core, shell or ligand, have influence in the accumulation process in all cases. The proposed bioaccumulation assay by employing zebrafish larvae has demonstrated that it is a

simple alternative to evaluate BCF values or metal accumulations since the obtained values are quite similar to those reported in the literature.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness for the financial support (CTQ 2014-55711-R) the European Project ORQUE SUDO E SOE3/P2/F591 and the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain), European funding from FEDER program (Project S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) and UCM for the financial support to the group “Elementos Traza y Especiación”. We gratefully thank Dr. C. Pecheyran for its support and supervision of S. Zarco stage in LCABE.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.077>.

References

- Barst, B.D., Gevertz, A.K., Chumchal, M.M., Smith, J.D., Rainwater, T.R., Drevnick, P.E., Hudelson, K.E., Hart, A., Verbeck, G.F., Roberts, A.P., 2011. Laser ablation ICP-MS co-localization of mercury and immune response in fish. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8982–8988. <http://dx.doi.org/10.1021/es201641x>.
- Blickley, T.M., Matson, C.W., Vreeland, W.N., Rittschof, D., Di Giulio, R.T., McClellan-Green, P.D., 2014. Dietary CdSe/ZnS quantum dot exposure in estuarine fish: bioavailability, oxidative stress responses, reproduction, and maternal transfer. *Aquat. Toxicol.* 148, 27–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.021>.
- Bouldin, J.L., Ingle, T.M., Sengupta, A., Alexander, R., Hannigan, R.E., Buchanan, R., 2008. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (9), 1958–1963. <http://dx.doi.org/10.1897/07-637.1>.
- Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M., 2014. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 211, 54–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.007>.
- Contreras, E.Q., Cho, M., Zhu, H., Puppala, H.L., Escalera, G., Zhong, W., Colvin, V.L., 2013. Toxicity of quantum dots and cadmium salt to *Caenorhabditis elegans* after multigenerational exposure. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1148–1154. <http://dx.doi.org/10.1021/es3036785>.
- Cuello, S., Sanz-Landaluze, J., Madrid, Y., Guinea, J., Cámara, C., 2012. Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a model. *Talanta* 89, 169–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.011>.
- Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., Chen, Y.-L., Pei, D.-S., 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 11–17. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2406>.
- European Chemicals Agency, 2013. Report. The Case for Expanding the Restriction on Cadmium and its Compounds in Plastics.
- Fernandez-Arguelles, M.T., Yakovlev, A., Sperling, R.A., Luccardini, C., Medel, A.S., Mallet, J., Brochon, J., Feltz, A., Oheim, M., 2007. Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoproboscopes. *Nano Lett.* 7 (9), 2613–2617. <http://dx.doi.org/10.1021/nl070971d>.
- Feswick, A., Griffith, R.J., Siebein, K., Barber, D.S., 2013. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquat. Toxicol.* 130–131, 210–218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.002>.
- Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P.C., Yu, H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* 22, 64–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>.
- Galeone, A., Vecchio, G., Malvindi, M. a., Brunetti, V., Cingolani, R., Pompa, P.P., 2012. In vivo assessment of CdSe–ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale* 4, 6401–6407. <http://dx.doi.org/10.1039/c2nr31826a>.
- George, S., Xia, T., Rallo, R., Zhao, Y., Ji, Z., Lin, S., Wang, X., Zhang, H., France, B., Schoenfeld, D., Damoiseaux, R., Liu, R., Lin, S., Bradley, K.A., Cohen, Y., Nel, A.E., 2011. Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebra fish embryo screening to develop hazard ranking for engineered nanomaterials. *ACS Nano* 5, 1805–1817. <http://dx.doi.org/10.1021/nn102734s>.
- Gholap, D.S., Izmer, A., De Samber, B., van Elteren, J.T., Selih, V.S., Evens, R., De Schampelaere, K., Janssen, C., Balcaen, L., Lindemann, I., Vincze, L., Vanhaecke, F., 2010. Comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and micro-X-ray fluorescence spectrometry for elemental imaging in *Daphnia magna*. *Anal. Chim. Acta* 664, 19–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.052>.
- Harper, S.L., Carriere, J.L., Miller, J.M., Hutchison, J.E., Maddux, B.L.S., Tanguay, R.L., 2011. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. *ACS Nano* 5, 4688–4697. <http://dx.doi.org/10.1021/nn200546k>.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IAC Monographs Eval. Carcinog. Risks to Humans 58. Lyon, France.
- Jackson, B.P., Bugge, D., Ranville, J.F., Chen, C.Y., 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5550–5556. <http://dx.doi.org/10.1021/es202864r>.
- Kim, J., Park, Y., Yoon, T.H., Yoon, C.S., Choi, K., 2010. Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. *Aquat. Toxicol.* 97, 116–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.022>.
- Kim, K., 2013. Integrating zebrafish toxicology and nanoscience for safer product development. *Green Chem.* 15, 872–880. <http://dx.doi.org/10.1039/c3gc36806h>.
- King-Heiden, T.C., Wicinski, P.N., Mangham, A.N., Metz, K.M., Nesbit, D., Pedersen, J.A., Hamers, R.J., Heideman, W., Peterson, E., 2009. Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1605–1611. <http://dx.doi.org/10.1021/es801925c>.
- Konz, I., Fernández, B., Fernández, M.L., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2012. Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2113–2125. <http://dx.doi.org/10.1007/s00162-012-6023-6>.
- Lackowicz, J.R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed. Springer, New York.
- Lewinski, N.A., Zhu, H., Jo, H., Pham, D.O.N., Kamath, R.R., Ouyang, C.R., Vulpe, C.D., Colvin, V.L., 2010. Quantification of water solubilized CdSe/ZnS quantum dots in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1841–1846. <http://dx.doi.org/10.1021/es902728a>.
- Li, J., Chang, X., Chen, X., Gu, Z., Zhao, F., Chai, Z., Zhao, Y., 2014. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnol. Adv.* 32, 727–743. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.009>.
- Liu, J., Katahara, J., Li, G., Coe-Sullivan, S., Hurt, R.H., 2012. Degradation products from consumer nanocomposites: a case study on quantum dot lighting. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3220–3227. <http://dx.doi.org/10.1021/es204430f>.
- Matz, C.J., Treble, R.G., Krone, P.H., 2007. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 44–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.11.001>.
- McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaff, J.M., DeForest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J., Green, A., 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1017–1037. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620220509>.
- METI-NITE, 2006. Biodegradation and Bioconcentration Database of the Existing Chemical Substances. Ministry of Economy, Trade and Industry (METI)- National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Japan.
- OECD, 2012. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, O.P. <http://dx.doi.org/10.1787/2074577x>.
- Pace, H.E., Leshar, E.K., Ranville, J.F., 2010. Influence of stability on the acute toxicity of CdSe/ZnS nanocrystals to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1338–1344. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.168>.
- Petosa, A.R., Jaisi, D.P., Quevedo, I.R., Elimelech, M., Tufenkji, N., 2010. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6532–6549. <http://dx.doi.org/10.1021/es100598h>.
- Peyrot, C., Gagnon, C., Gagné, F., Willkinson, K.J., Turcotte, P., Sauvé, S., 2009. Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150, 246–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.002>.
- Reibold, M., Paufler, P., Levin, A.A., Kochmann, W., Pätzke, N., Meyer, D.C., 2006. Materials: carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 444, 286. <http://dx.doi.org/10.1038/444286a>.
- Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101C, 29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.009>.
- Sanz-Landaluze, J., Pena-Abaurrea, M., Muñoz-Olivas, R., Cámara, C., Ramos, L., 2015. Zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo-based procedure for assessing bioaccumulation. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1860–1869. <http://dx.doi.org/10.1021/es504685c>.
- Sarrat, B., Bourrigaud, S., Billon, L., Pecheyran, C., 2011. Bioinspired material based on femtosecond laser machining of cast sheet micromolding as a pattern transfer process. *Langmuir* 27, 3174–3179. <http://dx.doi.org/10.1021/la104364n>.
- Shi, X., Liu, C., Wu, G., Zhou, B., 2009. Waterborne exposure to PFOS causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* 77, 1010–1018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.074>.
- Soenen, S.J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J.M., Parak, W.J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6, 446–465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2011.08.001>.

- Souid, G., Souayed, N., Yaktiti, F., Maaroufi, K., 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.015>.
- Tsoi, K.I.M.M., Dai, Q.I.N., Alman, B.A., Chan, W.C.W., 2013. Are quantum dots toxic? Discrepancy between cell culture and animal studies. *Acc. Chem. Res.* 46, 662–671. <http://dx.doi.org/10.1021/ar300040z>.
- Valledor, M., Campo, J.C., Coto-Garcia, A.M., Fernandez-Arguelles, M.T., Costa, J.M., Sanz-Medel, A., 2011. Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications. *Nanotechnology* 22. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/22/38/385703>, 385703(9pp).
- Wiecinski, P.N., Metz, K.M., Heiden, T.C.K., Louis, K.M., Mangham, A.N., Hamers, R.J., Heideman, W., Peterson, R.E., Pedersen, J.A., 2013. Toxicity of oxidatively degraded quantum dots to developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 43, 9132–9139. <http://dx.doi.org/10.1021/es801925c>.
- Yong, K.-T., Law, W.-C., Hu, R., Ye, L., Liu, L., Swihart, M.T., Prasad, P.N., 2013. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. *Chem. Soc. Rev.* 42, 1236–1250. <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35392j>.
- Yu, W.W., Qu, L., Guo, W., Peng, X., 2003. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater* 15, 2854–2860. <http://dx.doi.org/10.1021/cm034081k>.
- Zhang, W., Lin, K., Miao, Y., Dong, Q., Huang, C., Wang, H., Guo, M., Cui, X., 2012a. Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs. *J. Hazard. Mater* 213–214, 413–420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.014>.
- Zhang, W., Lin, K., Sun, X., Dong, Q., Huang, C., Wang, H., Guo, M., Cui, X., 2012b. Toxicological effect of MPA-CdSe QDs exposure on zebrafish embryo and larvae. *Chemosphere* 89, 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.012>.

Supporting Information for

BIOCONCENTRATION OF IONIC CADMIUM AND CADMIUM SELENIDE QUANTUM DOTS IN ZEBRAFISH LARVAE

S. Zarco-Fernández^{1#}, A.M. Coto-García^{1#}, R. Muñoz-Olivas^{1*}, J. Sanz-Landaluze¹, S. Rainieri², C. Cámara^{1*}

¹ Dpto. Química Analítica, Facultad CC. Químicas, Universidad Complutense, Avda. Complutense S/N, 28040, Madrid, SPAIN

² Food Research Division, AZTI-Tecnalia, 23 Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea 609, 24 48160 Derio, Spain.

Corresponding authors:

Riansares Muñoz: rimunoz@ucm.es Tel: + 34 91-3945158

Carmen Cámara: ccamara@ucm.es Tel: + 34 91-3944318

1a)

ICP/MS parameters	
RF Power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L/min)	15.0
Auxiliary gas flow rate (L/min)	0.30
Carrier gas flow rate (L/min)	1
Nebulizer Type	Slurry
Spray Chamber	Scott
Acquisition mode	Time Resolved Analysis
Monitored Isotopes	¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd

1b)

Laser Ablation parameters	
Ablated material	2*2 mm ²
Carrier gas	He
Beam diameter	20 μm
Frequency	300 Hz
Energy	56 mW
Speed	20 μm/s

Table S1: Operating conditions for Cd determination: 1a) ICP/MS conditions; 1b) LA-ICP/MS conditions.

Table S2: Calculation of QDs concentration.

Elemental Composition	QDs-P	QDs-C
[Cd] (mg/L)*	71 ± 3	202 ± 29
[QDs] (mg/L)**	332	1000
[QDs] μM ***	0.4	2.4

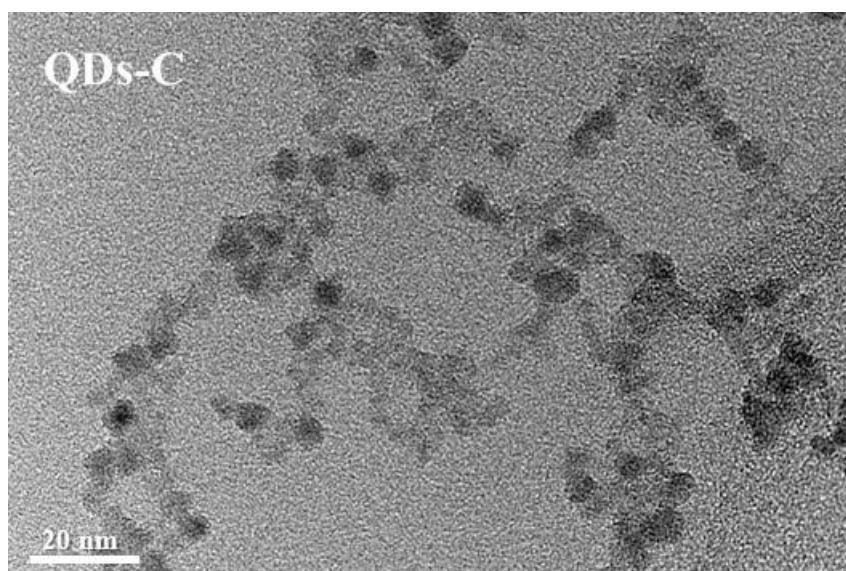
* Measured by ICP/MS

** Reported by the manufacturer

*** Estimated by UV/Vis spectrophotometry (Yu et al., 2003. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. Chem. Mater. 15, 2854–2860)

Figure S1: TEM micrographs obtained for stock solutions of QDs. 1a) QDs-C; 1b) QDs-P.

S1a



S1b

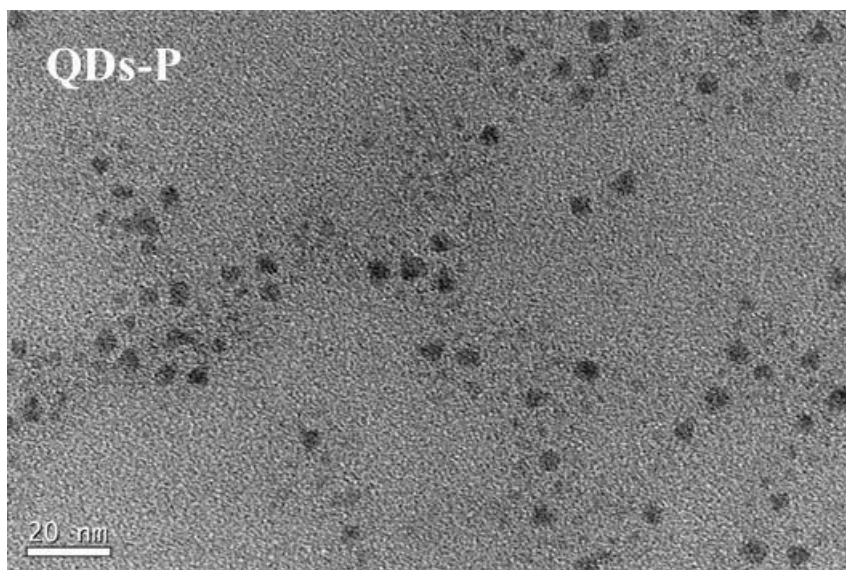
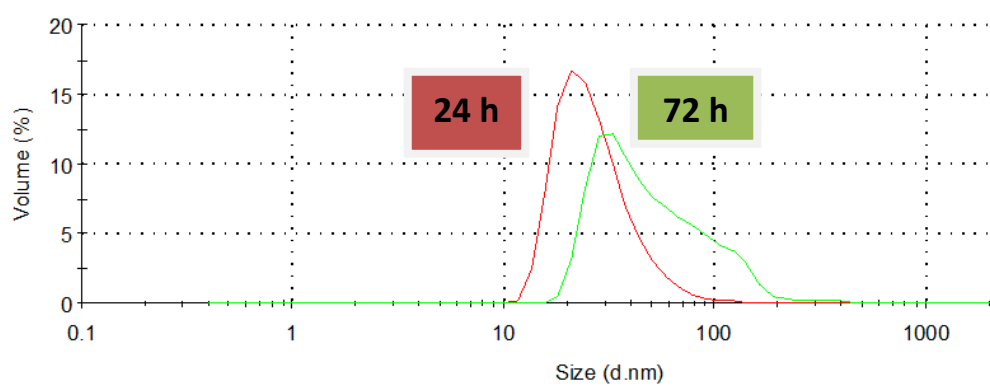


Figure S2: DLS spectra obtained for QD-C in the exposure media in presence of larvae. Red: 24 hours; Green: 48 hours.



Bioaccumulation of methylmercury, cadmium, silver and arsenic from exposure to mixtures in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos

Bioaccumulation of methylmercury, cadmium, silver and arsenic from exposure to mixtures in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos.

S. Zarco-Fernández, A. García-García, J. Sanz-Landaluze, C. Pecheyran** R. Muñoz-Olivas*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Science, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

**Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, UMR 5254 CNRS - Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France

KEYWORDS

zebrafish eleutheroembryos, bioconcentration, metals, mixture, LA-ICP-MS

SUMMARY

Currently the environmental pollution stands for a great importance problem. Bioconcentration studies and resolution spatial imaging by LA-ICP/MS, provide information on the persistence and toxicity of pollutants. Previous bioconcentration studies on classical contaminants as Hg, As, Ag and Cd have determined the BCF factors. In this work, zebrafish eleutheroembryos were exposed Hg, As, Ag and Cd following an alternative test to the OCDE technical guideline. To determine the metals concentrations using an inductively coupled plasma mass spectrometry in both cases, eleutheroembryos and exposure media. The BCF calculated were compared with the processed imaging by LA-ICP/MS. The bioconcentration results were comparable with both analytical techniques and offered new and relevant data.

1. INTRODUCTION

In this and the past century anthropogenic inputs in environment (industrial and agricultural activities, vehicle emissions and shipping traffics) have created serious risks to human health associated with exposure to heavy metals including arsenic, copper, lead, mercury and, to a lesser extent, zinc and cadmium¹⁻³. The elevated levels of trace metals may produce negative effects on fauna and flora in the environment and may cause damage to human health either through the food chain or through direct uptake. Therefore, environmental contamination caused by heavy metals has been related to organic morphological abnormalities, neurophysiological disturbances, genetic alteration of cells (mutation), teratogenesis and carcinogenesis^{4,5}. The deleterious effects of single metals on organisms have been fairly well documented, indeed, single metal toxicity tests are used to establish most water quality criteria. In contrast, aquatic organisms inhabiting metal-contaminated natural waters are almost always exposed to multiple metals. This point has been recognized by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) as being a key gap in metal risk assessments⁶. Nonetheless, the interpretation of bioaccumulation or toxicity results from metal mixtures is complex because there are chemical interactions

with constituents in the media, interactions with physiological processes and interactions at the site(s) of toxicity.

Over the past few years, the biotic ligand model (BLM) has been proposed as a tool to quantitatively predict the manner in which water chemistry affects the speciation and biological availability of metals in aquatic systems^{7,8}. BLM considers toxicity as a function of metal bound to the organism, it is somewhat analogous to the lethal body concentration approach, except that a distinction is made between metal binding to the whole body and to the site of toxic action⁹. BLM model uses thermodynamic calculations to evaluate competitive interactions among dissolved major and minor cations, inorganic and organic ligands, and biological receptors (or biotic ligands). Yet unanswered is whether it is possible to predict the toxicity of metal mixtures using equilibrium constants that have been determined from the interactions of single metals at a given site of toxic action on the organism. It is not really clear the relation between toxicity and bioaccumulation, but it is possible that body concentrations of metals bioaccumulated from mixture exposures may also be useful indicators of effects. However, interaction between the metals may affect their bioaccumulation and the determination of any interactive effect on bioaccumulation is necessary since several metals are often present together at elevated concentrations in contaminated environments.

Strictly speaking, the BLM describes metal-metal interactions only through a process of competitive inhibition of metal binding to the organism. However, competitive inhibition is only one possible form of inhibition. Others include non-competitive, anti-competitive, and mixed forms of inhibition^{10,11}. It is currently unclear whether metal mixtures should be modeled using a single uptake site or multiple, independent uptake sites^{12,13}. For a single uptake site in the presence of multiple metals, it is assumed that each chemical in the mixture contributes to toxicity through a common site of action; i.e., the same effect can be produced by replacing one chemical with an equally toxic amount of a different chemical¹⁴. This model will always predict competitive interactions leading to decreased bioaccumulation and decreased toxicological effects (or no change). Literature reviews of metal mixture studies for a wide range of organisms have shown that the majority (70–75%) of toxicological results are consistent with less or equal toxicity relative to addition methods^{12,13,15}. Pure competitive inhibition represents only one possible form of metal interaction. If there is more than one binding site on the ligand, several other possibilities also exist. These possibilities also allow for increased accumulation of a metal in the presence of another metal, and for partial inhibition at high inhibitor concentrations. Pure competitive inhibition, in contrast, only results in decreased metal accumulation in the presence of another metal, and bioaccumulation approaches⁹ as the inhibitor concentrations become extremely large. It is, therefore, important to also consider what happens when there are two binding sites on the ligand. For a model invoking independent uptake sites, the presence of a second metal should result in no change to bioaccumulation and either similar or increased toxicological effects as compared to single metal exposures. This model assumes that chemicals in mixtures act statistically independent of each other; i.e., chemicals with different sites of action may affect different physiological systems¹⁶. In each addition approach, biological responses to individual chemicals are combined to predict responses in mixtures of the chemicals^{17,18}. While the BLM has the capacity to model completely additive interactions by a two-site model and completely antagonistic interactions by a one-site model, synergism cannot be easily explained by equilibrium principles. Insight into the nature of the biotic ligands available for binding would appear to

be a key for a better understanding of bioaccumulation and toxicity in order to improve models of trace metal interactions in metal mixtures.

Because metals are often taken up by more than one transport system and because each system may predominate under different physicochemical conditions, the assumption that BLM binding sites are independent of one other is necessarily an oversimplification. Such complex interactions may explain a number of the exceptions that have been observed to the BLM¹⁹. Given that the BLM is more concerned with toxicity (or biological effects) than bioaccumulation, the superposition of toxicity results on top of this already complex scenario would appear to be difficult. Nonetheless, if one assumes that biological effects result from accumulated metal, the above results should be useful in better understanding the complexity of metal-metal interactions and should help facilitate the development of more rigorous tools for their prediction. It will be necessary to keep these limitations in mind when applying the BLM to natural waters containing multiple contaminants.

Bio-imaging analytical techniques are an emerging interest in life sciences studies. Laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry is a versatile method for obtaining biological images. This information helps us understand biological processes^{20–22}.

In this work we have quantified the amount of different metals accumulated by zebrafish eleutheroembryos exposed to a mixture of arsenic, cadmium, methylmercury and silver and evaluated the bioconcentration factors of these metals comparing the mixture and the individual exposure. Also an analytical methodology based on laser ablation coupled ICP/MS has been developed and employed to evaluate metal distribution within the zebrafish eleutheroembryos after exposition.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Instrumentation

Microwave acid digestion for CRM was performed in a 1000 W MSP microwave oven (CEM MSP 1000, Matheus, NC). Acid digestion for samples was carried out into polytetrafluoroethylene (PTFE) at 40°C in the oven (Selecta, Barcelona, Spain). A centrifuge model FVL-2400N from Combi-Spin (Boeco, Germany) was used for sample centrifugation. Inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) HP-7700 Plus (Agilent Technologies, Analytical System, Tokyo, Japan) equipped with a conical nebulizer, Fassel torch and double pass Scott-type spray chamber cooled by a Peltier system was employed to determine total cadmium, mercury, arsenic and silver content. Ion monitoring at m/z ¹¹¹Cd, ¹¹⁴Cd, ²⁰⁰Hg, ²⁰²Hg, ⁷⁵As, ¹⁰⁹Ag and ¹¹⁵In ²⁰⁹Bi as internal standard selected for data collection. The sample was introduced by flow injection valve (FI) using a 300 µL injection loop.

Laser ablation coupled to ICPMS (LA-ICPMS), spatial distribution of metals on larvae exposed to mix metals was performed by elemental mapping in zebrafish larvae, using a KGW-Yb crystal infrared femtosecond laser (ALFAMET, Novalase Sa, Amplitude Systemes, France) coupled to ICP-MS (Perkin Elmer Sciex ELAN 6100). The ablated material, approximately 2x2 mm², was transported using He as carrier gas flow to ICPMS. ¹¹¹Cd, ²⁰²Hg, ⁷⁵As, ¹⁰⁹Ag, ¹⁹⁷Au, and ¹³C isotopes were monitored in the ICP/MS. Data obtained were

exported for further treatment (PAMAL, Plataformed'Analyse des Métaux traces par Ablation Laser), for imaging processing^{23,20,24}.

2.2. Reagents

Analytical grade chemicals were used for all experiments. Standard Solutions used to work, were ionic cadmium solution (1000 mg·L⁻¹ Cd, Sigma Aldrich), mercury, (1000 mg·L⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany), silver (1000 mg·L⁻¹, Sigma Aldrich), arsenic (10150 mg·L⁻¹ Sigma Aldrich), Bismuth (1000 mg·L⁻¹, Spectrosol, England) and indium (1000 mg·L⁻¹, CPI international, USA) were used to prepare the standard solutions. Stock work solutions were prepared using Milli-Q Element ultrapure water (Millipore). Sub-boiled nitric acid (HNO₃ 60% Scharlau, Barcelona, Spain), hydrogen peroxide (H₂O₂ 35 %, Panreac) were used to determination total metal content. Larvae exposure solution (ISO water) of similar composition to fresh river water was prepared with KCl, NaHCO₃ (Panreac), CaCl₂·2H₂O and MgSO₄·7H₂O (Sigma) were diluted in distilled water. A Certificate Reference Material, Shellfish BCR ERM-CE278k (European Commission, JRC, Belgium) was employed to validate de method. The carrier solution by ICPMS for flow injection (FI) mercury determination contained KCl (Riedel-de Haën AG, Berlin, Germany), HCl and 2-mercaptoetanol (Merck).

2.3. Procedure of zebrafish eleutheroembryos exposure

Zebrafish larvae were obtained from wild type adult zebrafish bred and maintained in AZTI Zebrafish Facility (EU-10-BI) under standard conditions. All the experimental procedures were approved by the Regional Animal Ethics Committee. The OECD technical guidance (OECD, 2012)²⁵ was used as reference to establish the experimental conditions for larvae growing as well as the nominal concentrations for the contaminant exposure.

Exposure solution (ISO water) was prepared of similar composition to fresh river water: 294 mg of CaCl₂·2H₂O, 123.3 mg of MgSO₄·7H₂O, 63 mg of NaHCO₃ and 5.5 mg of KCl per litre were diluted to 1 L in distilled water. Conditions of this exposure solution were 26±2°C, dissolved oxygen ≥60% and pH 6-8,5. To obtain the eleutheroembryos, it was necessary to develop the embryos of 72 h post fecundation (hpd). Exposure experiments were performed in two tanks, first for control and the second for the zebrafish spiked with the metals. The procedure applied consisted in two phases: *absorption* from 0 to 48 h of exposure in the contaminated media; and *depuration*, additional 24 h of exposure in clean ISO water. About 15 eleutheroembryos were removed from the tanks at different absorption time 0, 18, 24, 41, 48 hours, and depuration time 50, 65, 72 hours and ultraforzen until analysis. The concentration of the target analyte was determined in both eleutheroembryos and exposure media all throughout the experiment. According to the OECD test 305, the loading rate of eleutheroembryos between 0.7 and 0.8 g·L⁻¹ (wet weight) and the mortality of eleutheroembryos were lower than 20%.

The nominal concentration was selected for each analyte according to the OECD test 305, between 0.1-1 % of the LC₅₀. These values of LC₅₀ were selected from the information found in the literature. For ionic silver, data values found are between 15-35 µg·L⁻¹ for fish embryos^{26,27}; respect inorganic arsenic bibliography data indicates values around 15-50 mg·L⁻¹ ^{28,29}. In the case of ionic cadmium, the information found for LC₅₀ was 2 mg·L⁻¹ ^{30,31} and for methylmercury, the data values, a LC₅₀ value of 250 µg L⁻¹ for CH₃Hg was collected from METI-NITE Japan database³². Accordingly with these data, the nominal concentration selected to carry out the exposure experiments were 0.1 µg·L⁻¹, 50 µg·L⁻¹, 10 µg·L⁻¹ and 25 µg·L⁻¹ for Ag, As, Cd and CH₃Hg respectively. The exposure solution was changed every 24

h, assuming that nominal concentration of the chemical substances do not fluctuate more than 20% throughout the whole experiment as required by OECD 305.

2.4. Analytical procedure

Determination of mix metals concentration in exposure media by ICP-MS

Exposition solutions were performed by a flow injection (FI) system coupled to the ICP-MS using a carrier solution containing 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.15% (w/v) KCl in order to reduce likely mercury memory effects³³.

Determination of mix metals concentration in zebrafish eleutheroembryos by ICP-MS

Total content analysis were carried out applying acid digestion. For that, about 15 specimen were placed into Teflon vessels with 200 µL of HNO₃ and 100 µL of H₂O₂, during 4h at 85°C. Finally, the samples were diluted to 1 mL³⁴. Exposition solutions and zebrafish eleutheroembryos samples were enriched with a solution containing In and Bi as internal standard such that the final concentration in each sample was 30 µg·L⁻¹. The optimal conditions for both determinations by ICP-MS are summarized in Table 1.

Metals total content were analyzed using a CRM Shellfish ERM-CE278k, applying a microwave oven (CEM MSP 1000, Matheus, NC). Final extracts were filtered through a 0.22 µm nylon filter. Metals determination were performed by flow injection system (FI) coupled to ICP-MS for method validation.

ICP-MS	AGILENT HP-7700 PLUS
RF power	1550 w
Flow Ar	15 L·min ⁻¹
Auxiliary gas flow (Ar)	1 L·min ⁻¹
Nebulizer gas flow (Ar)	0,75 L·min ⁻¹
Reaction gas flow (H ₂)	4,0 L·min ⁻¹
Isotopes	⁷⁵ As, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ²⁰¹ Hg, ²⁰² Hg (¹¹⁵ In, ²⁰⁹ Bi (IS))

Table 1: Optimal conditions of total analysis by ICP-MS

Metals distribution into zebrafish eleutheroembryos by LA-ICP-MS

Zebrafish eleutheroembryos exposed to As, Ag, Cd and MeHg were analyzed by LA-ICP-MS, trying to locate the different elements inside and to get more information about the bioaccumulations pathways. Two procedures were developed for this purpose. Firstly, the eleutheroembryos were dehydrated in a series of water/toluene/acetone mixtures, and embedded in paraffin³⁵. Second procedure, zebrafish eleutheroembryos were ultra-frozen until use. In both cases, the samples were placed over a polycarbonate plate and were metallized for 40 s at 30 mA with a thin gold layer to be employed as internal standard, in order to improve de signal³⁶. All parameters are summarized in Table 2.

ICP-MS	PERKIN ELMER SCIEX (ELAN DRC II)
RF power	1000 w
Flow Ar	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow (Ar)	1 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow (Ar)	0,86 L min ⁻¹
Cones	Ni (skimmer and sample)
Isotopes	⁷⁵ As, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ²⁰¹ Hg, ²⁰² Hg (¹¹⁵ In, ²⁰⁹ Bi (IS))
LA system	ALFAMET NOVALASE
Crystal	KGW:Yb
λ	1030 nm
Repetition rate	300 Hz
Laser energy	37 μJ
Cell volumen	15 cm ³
Spot size	20 μm
Speed rate	20 μm s ⁻¹
Carrier gas flow (He)	0,3 L min ⁻¹

Table 2: LA-ICP/MS parameters by metal distribution in zebrafish larvae

2.5. Quality assurance

Quality assurance included controls, replicates analysis, CRM and calibrations. Linearity, drift check and spike recovery analyses were carried out using proper zebrafish eleutheroembryos by triplicate. The detection limits in eleutheroembryos were 0.01 μg·g⁻¹, 0.005 μg·g⁻¹, 0.003 μg·g⁻¹, 0.004 μg·g⁻¹ for As, Ag, Cd and MeHg, respectively, and 0.05 μg·L⁻¹, 0.01 μg·L⁻¹, 0.02 μg·L⁻¹ and 0.07 μg·L⁻¹ for As, Ag, Cd and MeHg respectively in exposure media. Calibrations showed good linearity (R=0.99). Validation was applied by the analysis of Shellfish ERM-CE278k getting quantitative recovery for metals as can be shown in Table 3.

	⁶⁵ Cu	²⁰⁸ Pb	¹¹¹ Cd	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	²⁰² Hg
Certificate	5,98±0,27	2,18±0,18	0,336±0,025	6,7±0,4	1,62±0,12	0,071±0,007
Obtained	5,18±1,03	2,22±0,37	0,349±0,045	6,8±0,3	1,53±0,36	0,070±0,016

Table 3: Certified concentrations and results obtained (mg·kg⁻¹) for CRM Shellfish ERM-CE278k.

2.6. Toxicokinetics and statistics (BCF)

Bioconcentration factor can be calculated according to the OCDE guideline²⁵. BCF was estimated as the ratio between the concentration of the compound in the target organism, at the maximum time of uptake and the mean of the in the exposure media (BCF_{48h}). When the steady state is not reached, BCF values can also be calculated from a first order two-compartment (water and aquatic organism)^{37,38} model which describes the uptake and the depuration process as:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f \quad (1)$$

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 \cdot C_f \quad (2)$$

Where C_f is the concentration in fish ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$), t is the exposure time (h), k_1 is the first order uptake constant ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), C_w is the concentration of the chemical in the exposure media ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and k_2 is the first order elimination rate constant (h^{-1}). Assuming that at t_0 the concentration of the test substance in fish is negligible and the concentration of the tested compound in the media is constant, it is obtained that uptake and depuration process as:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (3)$$

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad (4)$$

When $C_{f,0}$ denotes the analyte concentration in the organism, when the depuration phase starts. This model has been employed, but sometimes, this method is not suitable to fit experimental data and more complex methods have been employed. Experimental kinetics data were done using the software NONLIN 5.1 (Nashville, TN)³⁹. BCFs were calculated applying the two procedures, obtaining BCF_{48h} and BCF_k.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization exposure concentration

Prior to bioaccumulation assay, a toxicity study with the metal mixture was carried out in the zebrafish eleutheroembryos to check the more suitable concentrations. Four different range of metals were chosen and have been summarized in table 4. From this, exposure to *Mix 3* and *4* led to high mortality of the eleutheroembryos, and was then discarded. *Mix 1* and *2* concentrations corresponded to nominal concentration 0.1% and 1% of LC₅₀ respectively. *Mix 2* was selected for further experiments in order to reach the quantification of all elements, especially in the case of MeHg.

	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4
As	5	25	50	100
Ag	1	10	25	50
Cd	5	50	100	500
MeHg	0,01	0,1	0,5	1

Table 4: Optimization concentration (in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of exposure media

3.2. Optimization zebrafish eleutheroembryos treatment

Microwave system was using to carry out the acid digestion of the samples. Microwave program consisting of temperature ramp, starting to $25^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ at $150^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ during 15 minutes. Around 15-20 zebrafish eleutheroembryos were ultrafrozen per eppendorf, these eppendorfs were divided in two part, one the eleutheroembryos and the other, the liquid. Zebrafish larvae were digested and analyzed by ICP-MS, while the liquid was diluted prior its analyses by ICP-MS. The results showed high concentrations for Ag and Hg in the liquid respect to the larvae. Therefore, these results demonstrated the transfer between larvae and frozen media, requiring the analysis of all eppendorf content.

3.3. Bioconcentration experiment

Metals concentration monitoring in the exposure media

Obtained metal concentration in exposure media during the two steps, accumulation (48h) and depuration periods (24h) has been recorded on Figure 1. According to OECD test 305, chemical concentration should not fluctuate more that 20% of the mean during the absorption phase, for a suitable BCF estimation. Arsenic concentration showed a variation around 10% ($39.1\pm 3.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), clearly achieving the limitation of the official guideline. For cadmium and methylmercury results obtained ($5.1\pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.6\pm 1.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively) the variation was slightly higher than limited by guideline, but still acceptable. On the contrary, variation on silver concentration ($0.03\pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was clearly higher than 20%, mainly due to the very low concentration selected. These variations have been in many other bioaccumulation studies^{32,34} in which concentration was monitored during the experiment. The majority of bioaccumulation studies employed nominal concentration and did not quantify real concentrations during the whole experiment for the calculation of toxicokinetics parameters.

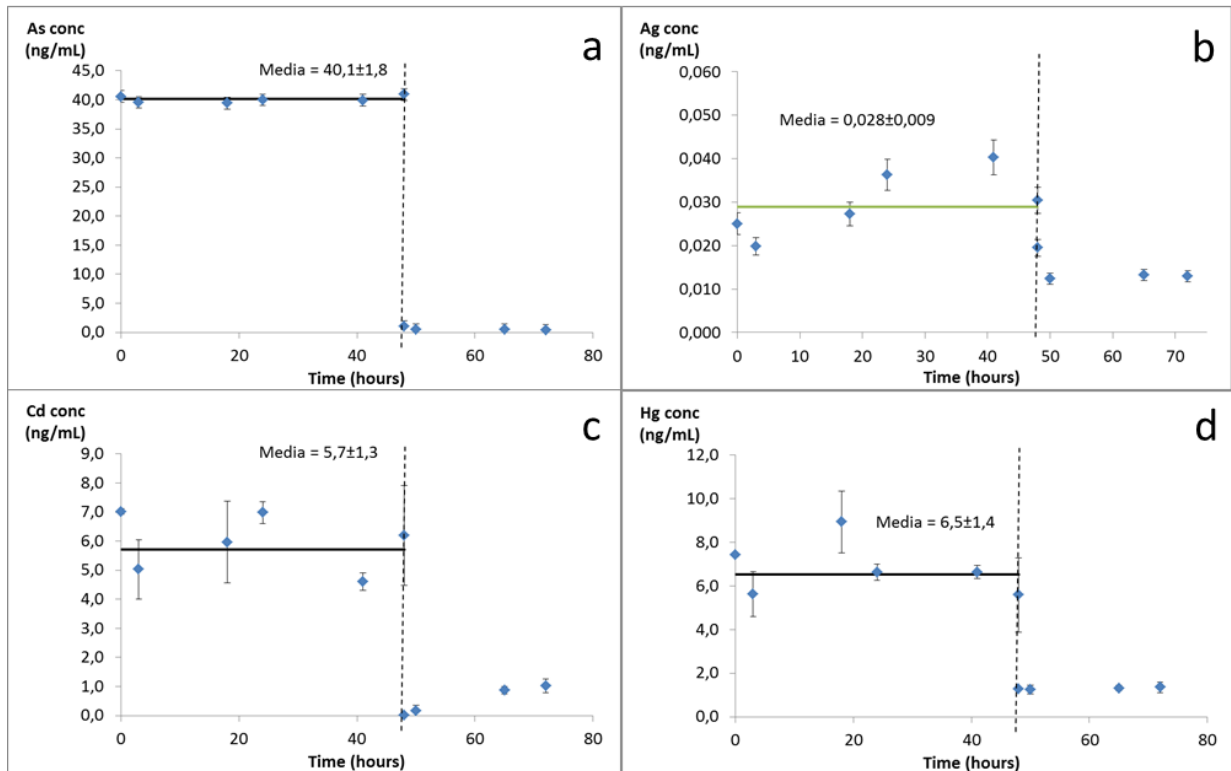


Figure 1: Representation of the concentration media variation, a) As, b) Ag, c) Cd and d) Hg

Metals concentration in the zebrafish eleutheroembryos

The results of the application of the toxicokinetic model exposed above have been plotted in Figure 2. It reflects the increase of all metal concentration in eleutheroembryos during the absorption phase, but with a quite different profile. For arsenic, this increase was quick reaching a stationary stage. Similar results were obtained for silver, although the increment was not so relevant. For methylmercury and cadmium, however, the increase is much gentler and the saturation is not so clearly observed. Concerning the depuration period the same tendencies for these two groups of elements are followed; this is, a softly decrease for methylmercury and cadmium (the adjustment in the model employed is even controversial) whereas clear depuration of arsenic and silver seems to be reached.

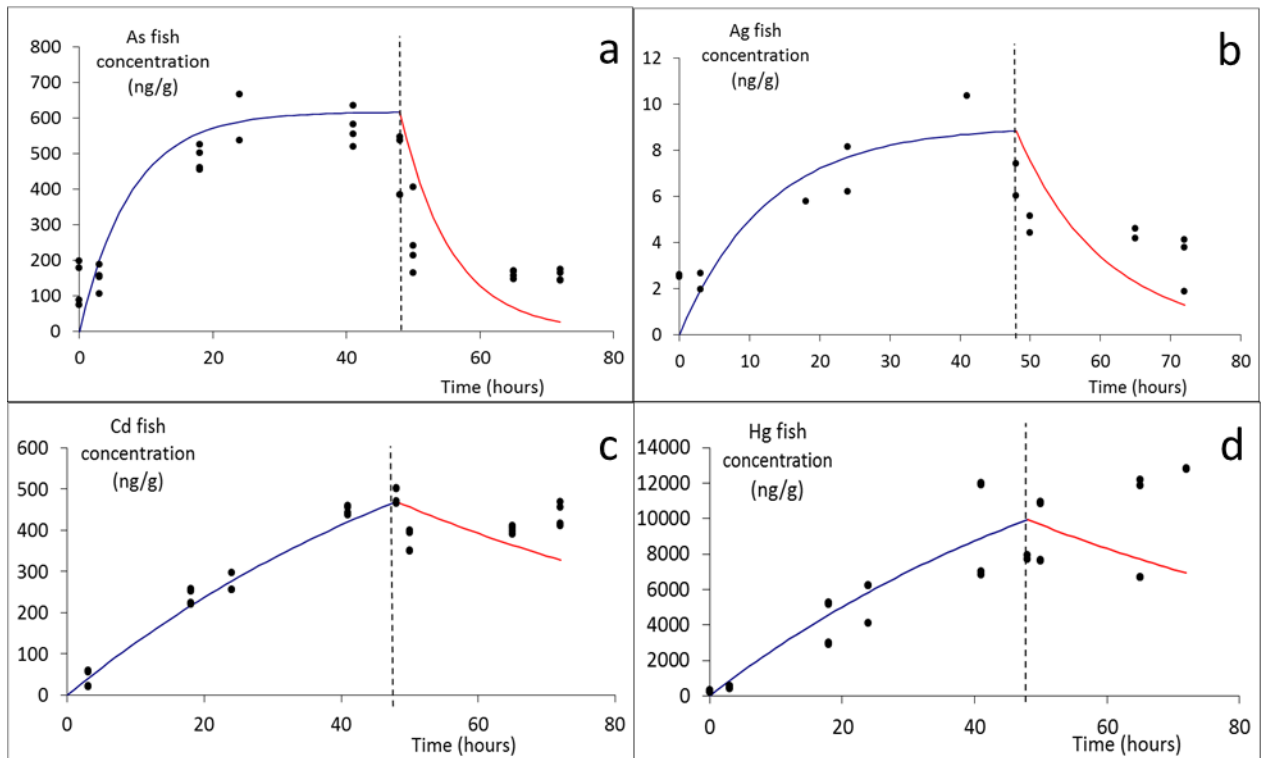


Figure 2: Bioaccumulation curve by zebrafish eleutheroembryos, a) As, b) Ag, c) Cd and d)Hg

Bioconcentration factor calculation

The experimental data showed in Figure 3 fitted to the first-order kinetic model (equation 3 and 4) in order to get k_1 and k_2 and bioconcentration factors as explained before (BCF_{48h} and BCF_k). Adjustments were performed using the NONLIN software, which is specific for no linear adjustments. Results have been summarized in Table 5.

Element	Mix of metals				Single metal			
	k_1 ($L \cdot k^{-1} \cdot h^{-1}$)	k_2 (h^{-1})	BCF_k	BCF_{48h}	k_1 ($L \cdot k^{-1} \cdot h^{-1}$)	k_2 (h^{-1})	BCF_{exp}	$BCF_{NITE-MITE}$
As	2	0,13	15,4	12	5	0,4	12,5	4
Cd	2,4	0,015	160	95	0,7	0,002	350	310
MeHg	44,5	0,015	2967	1697	35	0,015	2333	1800
Ag	25	0,08	312	240	14	0,06	233	250

Table 5: BCF values obtained by applying equations 3 and 4.

The main aim of this work was to compare likely differences obtained when calculating BCFs for single metal exposure or mixture exposure. Differences found in BCF_{48h} and BCF_k of the metal mixture values is more noticeable in the case of cadmium and methylmercury and could be mainly because, as mentioned before, absorption of these elements is continuous but slow: a similar pathway can be observed for single exposure^{30,34}. As a result,

after 48 hours the steady stage has not been reached but the model employed allows predicting the BCF value at this steady stage (BCF_k). Comparing the data obtained for the other two elements, As and Ag, the values are equal practically for As and less difference is showed for Ag. Similarly, the tendency of bioconcentration is the same independently of single or mixture exposure^{26,29}. Norwood et al.⁴⁰ and Komjarova et al.¹¹ found significant reduction on cadmium accumulation by *Hyalella azteca* and zebrafish respectively when exposed to metal mixtures comparing with exposed to cadmium alone. Also the slight enhancement of As accumulation was detected when exposed to mixtures which first well with our results⁴⁰. In addition, those papers showed inhibition of Cd accumulation by arsenic with a significant interaction factor of 0.795, whereas the interaction factor of Cd on As accumulation was 1.261. Also presence of other ions as calcium and sodium has been shown to decrease branchial Cd uptake in rainbow trout, yellow perch, and tilapia during both short time or chronic exposures⁴¹⁻⁴³. Norwood et al., also proposes that another possibility in which enhanced bioaccumulation could occur if a corresponding inhibition of excretion occurs⁴⁰. Data obtained in our work only shows a significant increase in depuration factor (k_2) for cadmium, corresponding with a decrease in the BCF value for this metal, but no further effect can be claim. Since the concentrations of the metals were not varied in our experiments, it is not possible to distinguish the difference between non-competitive and competitive inhibition. On the other hand, Abbound and Wilkinson have found in *Chlamydomonas reinhardtii* a reduction of Cd biouptake by up to 44% in the presence of other metals. A clear identification of what type of inhibition is occurring requires an experimental design in which each metal is varied individually while the other metals are held constant⁹.

Therefore, not all metal interactions can be described by a competitive inhibition model such as the BLM and it is possible that not all metals bind to the same type of binding site⁴⁰. Both statements are plausible considering that metals, during chronic and sublethal exposures, could be binding to transport proteins in the membranes and metabolic sites within a cell, including cytosolic ligands such as enzymes and metallothioneins. Other relationships, such as non-competitive and anticompetitive interactions, may be occurring and there is the possibility that there may be more than one binding site on the organism, internal or external. Other case studies have observed synergistic or enhanced bioaccumulation of one metal in the presence of a second metal⁴⁴.

These results do, however, allow for the design of more focused investigations that can specifically target metals that can interact each other. As well, it is not yet known if these changes in bioaccumulation will translate into changes in effects and, thus, the next step must be to determine the resulting chronic toxicity of the metal mixture and the relationship to bioaccumulation. On the other hand, to accurately predict trace metal toxicity in different waters, it is important to understand how variations in water chemistry change metal uptake, accumulation, and toxicity at exposure levels similar to those in the real environment.

3.4. Metals distribution in zebrafish eleutheroembryos

The different metals distribution was carried out by LA-ICP-MS. Sample optimization was necessary, developing two different procedures. Firstly, zebrafish eleutheroembryos were dehydrated and washed in subsequent solvent steps, namely water, toluene and acetone;

then, the sample was embedded in paraffin. The second procedure consisted in using directly the ultrafrozen eleutheroembryos. In both cases, samples were placed over a polycarbonate plate and metallized with gold as internal standard as explained in the experimental section. Images are showed in Figure 3. It is noticeable the differences between the two protocols applied. In paraffin samples the signal significantly decreased with respect to ultrafrozen samples, probably due to the different dehydration steps which involved high sample handling in contrast to ultrafrozen samples that were directly analyzed.

Concerning the BCF data calculated in the previous section, the images have validated such data. This is, methylmercury and cadmium accumulation can be easily showed in the images, mainly accumulated in the eyes area for Cd or along the digestive tract for methylmercury while arsenic and silver accumulation was not significant and the images showed only small traces for As and practically none for Ag.

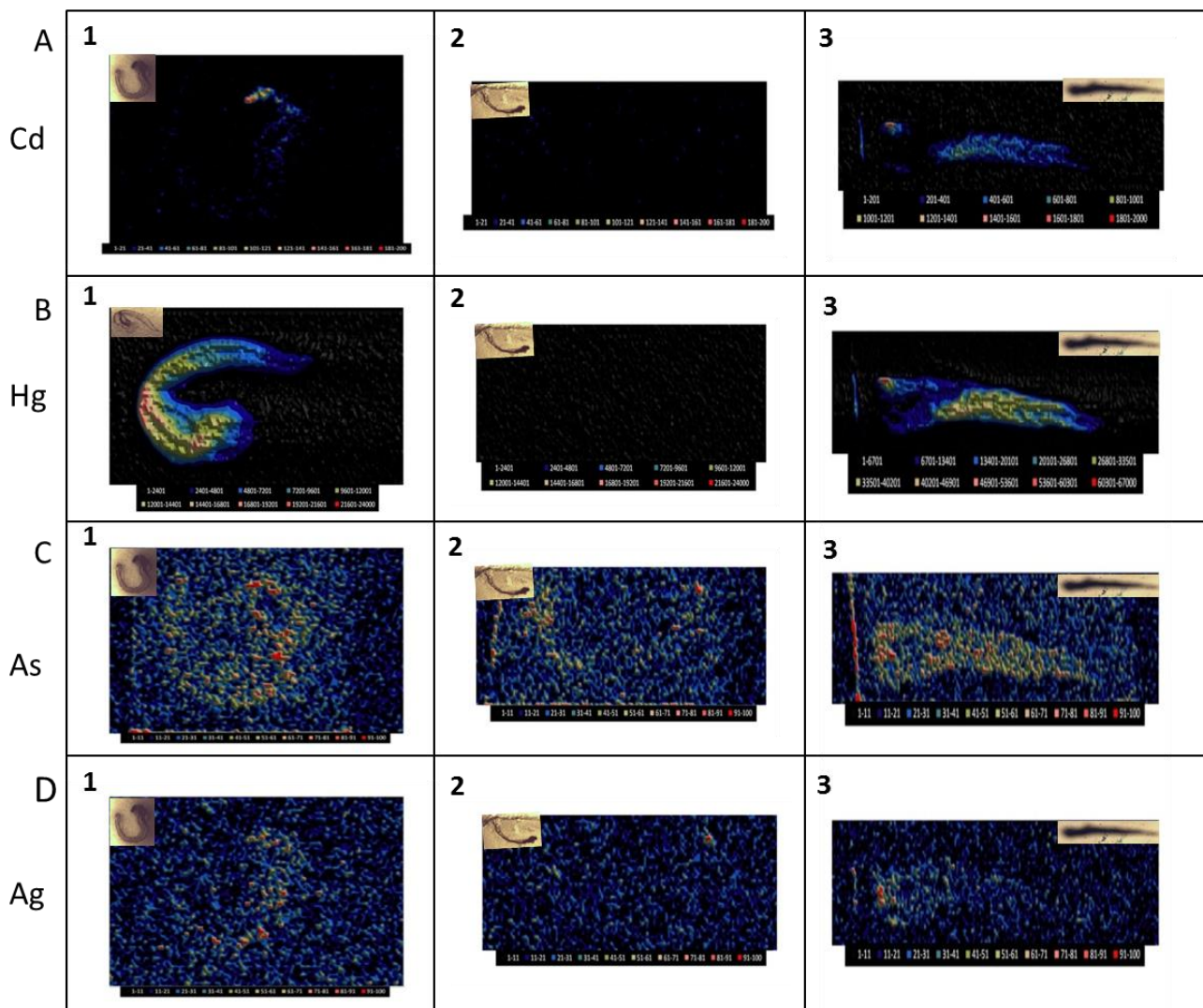


Figure 3: Optimization sample treatment by LA-ICP-MS. “1” is the paraffin procedure, “3” is the ultrafrozen and “2” is the control. A,B,C and D showed the bioaccumulation for each element

CONCLUSIONS

So far, the existent bibliography about of metals mixture effects has been mainly based on toxicity studies. Our investigation suppose an advance for understanding the possible interactions and competition reactions between them but other experiments are needed in order to define if competitive and anticompetitive effects can be observed after varying some metals concentrations by keeping other constant. It was clear that interactions between metals did affect bioaccumulation; however, the mechanisms that control these interactions cannot be determined from these experiments. Results obtained here, together with several toxicity and bioaccumulation studies of the effects of metal mixtures revealed that there was no consistent method of quantifying the effects of exposure to mixtures of metals. It is evident that more research is required to quantify the effects of exposure to mixtures of metals and determine appropriate methods for assessment and prediction of mixture effects that can have practical application to the protection of aquatic life. On the other hand, laser ablation analysis has confirmed the bioconcentration factor calculated

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministry of Research and Innovation and the AVANSECAL project. (CTQ2014-55711-R and CTQ2014-54801-C2-1-R)

BIBLIOGRAPHY

- (1) Su, C.; Jiang, L.; Zhang, W. *Environ. Skept. Critics* **2014**, 3 (2), 24.
- (2) Bharti, P. K. *Heavy Metals in Environment. Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrucken, Germany, ISBN: 978-3-659-15133-0; 2012.*
- (3) Abboud, P.; Wilkinson, K. J. *Environ. Pollut.* **2013**, 179, 33.
- (4) Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J. *EXS* **2012**, 101, 133.
- (5) Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N. *Interdiscip Toxicol* **2014**, 7 (2), 60.
- (6) Fairbrother, A.; Wenstel, R.; Sappington, K.; Wood, W. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, 68, 145.
- (7) Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G.; Delos, C. G.; Toro, D. M. Di; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hostrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. .; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B. *Comp. Biochem. Physiol., Part C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, 133 (1–2), 3.
- (8) Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. *Environ. Chem.* **2005**, 2 (1), 9.
- (9) Borgmann, U.; Norwood, W. P.; Dixon, D. G. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2008**, 14 (2), 266.
- (10) Chen, Z. Z.; Zhu, L.; Wilkinson, K. J. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 3580.
- (11) Komjarova, I.; Blust, R. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 7225.
- (12) Norwood, W. P.; Borgmann, U.; Dixon, D. G.; Wallace, A. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2003**, 9, 795.
- (13) Balistreri, L. S.; Mebane, C. A. *Sci. Total Environ.* **2014**, 466–7, 788.
- (14) Altenburger, R.; Backhaus, T.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L. H. *Env. Toxicol Chem* **2000**, 19 (9), 2341.
- (15) Vijver, M. G.; Elliott, E. G.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Snoo, G. R. de. *Env. Toxicol Chem* **2011**, 30, 1482.
- (16) Backhaus, T.; Altenburger, R.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L. H. *Env. Toxicol Chem* **2000**, 19 (9), 2348.
- (17) Olmstead, A. W.; LeBlanc, G. A. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2005**, 1, 114.
- (18) Rider, C. V.; LeBlanc, G. A. *Toxicol Sci* **2005**, 87, 520.
- (19) Hassler, C. S.; Wilkinson, K. J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, 22 (3), 620.
- (20) Gholap, D. S.; Izmer, A.; De Samber, B.; van Elteren, J. T.; Selih, V. S.; Evens, R.; De Schampelaere, K.; Janssen, C.; Balcaen, L.; Lindemann, I.; Vincze, L.; Vanhaecke, F. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 664 (1), 19.
- (21) Bonta, M.; Lohninger, H.; Marchetti-Deschamann, M.; Limbeck, A. *Analyst* **2014**, 139, 1521.
- (22) Zarco-Fernández, S.; Coto-García, A. M.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz-Landaluze, J.; Rainieri, S.; Cámara, C. *Chemosphere* **2016**, 148, 328.

- (23) Sarrat, B.; Bourrigaud, S.; Billon, L.; Pecheyran, C. *Langmuir* **2011**, *27*, 3174.
- (24) Barst, B. D.; Gevertz, A. K.; Chumchal, M. M.; Smith, J. D.; Rainwater, T. R.; Drevnick, P. E.; Hudelson, K. E.; Hart, A.; Verbeck, G. F.; Roberts, A. P. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 8982.
- (25) OECD/OCDE. *Test No 305: Bioaccumulation in Fish : Aqueous and Dietary Exposure*; 2012; Vol. Section 3,.
- (26) López-Serrano, A.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz-Landaluze, J.; Olasagasti, M.; Rainieri, S.; Cámara, C. *Environ. Pollut.* **2014**, *191*, 207.
- (27) Chae, Y. J.; Pham, C. H.; Lee, J.; Bae, E.; Yi, J.; Gu, M. B. *Aquat. Toxicol.* **2009**, *94* (4), 320.
- (28) Shah, A. Q.; Kazi, T. G.; Arain, M. B.; Jamali, M. K.; Afridi, H. I.; Jalbani, N.; Baig, J. A.; Kandhro, G. A. *Food Chem.* **2009**, *112* (2), 520.
- (29) Lopez-Serrano Oliver, A.; Sanz-Landaluze, J.; Muñoz-Olivas, R.; Guinea, J.; Cámara, C. *Water Res.* **2011**, *45* (19), 6515.
- (30) Zarco-Fernández, S.; Coto-García, a. M.; Muñoz-Olivas, R.; Sanz-Landaluze, J.; Rainieri, S.; Cámara, C. *Chemosphere* **2016**, *148*, 328.
- (31) Matz, C. J.; Treble, R. G.; Krone, P. H. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, *66* (1), 44.
- (32)
- (33) Harrington, C. F.; Merson, S. a.; D'Silva, T. M. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *505* (2), 247.
- (34) Cuello, S.; Sanz-Landaluze, J.; Madrid, Y.; Guinea, J.; Cámara, C. *Talanta* **2012**, *89*, 169.
- (35) Sabaliauskas, N. a.; Foutz, C. a.; Mest, J. R.; Budgeon, L. R.; Sidor, A. T.; Gershenson, J. a.; Joshi, S. B.; Cheng, K. C. *Methods* **2006**, *39* (3), 246.
- (36) Konz, I.; Fernández, B.; Fernández, M. L.; Pereiro, R.; González, H.; Alvarez, L.; Coca-Prados, M.; Sanz-Medel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (10), 3091.
- (37) Gobas FAP.; Zhang X. *Chemosphere* **1992**, *25*, 1961.
- (38) Sanz-Landaluze, J.; Pena-Abaurrea, M.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C.; Ramos, L. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 1860.
- (39) Sherrod PN. 1995,.
- (40) Norwood, W. P.; Borgmann, U.; Dixon., D. G. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 255.
- (41) Hollis, L.; McGeer, J. C.; McDonald, D. G.; Wood, C. M. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, 2725.
- (42) Niyogi, S.; Kent, R.; Wood, C. M. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* **2008**, *148*, 305.
- (43) Zhang, L.; Wang, W. X. *Aquat. Toxicol* **2007**, *84*, 173.
- (44) Amiard-Triquet, C.; Amiard, J. C. *Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. In: Langston,W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chap. 11. Chapman & Hall, London,; 1998.*

Discusión / Conclusiones

DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo incluido en esta tesis ha consistido en desarrollar herramientas para la evaluación de los posibles efectos tanto de contaminantes clásicos: mercurio, arsénico, cadmio y plata, como de contaminantes emergentes, las nanopartículas de Quantum Dots. Para ello, se ha dividido el trabajo en dos partes: un primer bloque se ha basado en el desarrollo de nuevos materiales y métodos para eliminar el mercurio del medio circundante y ofrecer alternativas a las técnicas de especiación tradicionales; y un segundo bloque que está centrado en estudios de acumulación, transformación y su posible eliminación, mediante la aplicación de modelos vivos: *Arabidopsis thaliana* y *Danio rerio* (pez cebra). Las dos aproximaciones tienen como finalidad avanzar en los campos de la especiación y también para en un futuro plantear estrategias de remediación de zonas contaminadas, mediante la utilización de filtros o membranas con nuevos materiales altamente adsorbentes o mediante plantas y los mecanismos implicados en la acumulación de estos contaminantes en los organismos.

Nuevos materiales selectivos para la especiación de mercurio

Los materiales poliméricos desarrollados se han obtenido utilizando el protocolo de polimerización por precipitación. Los componentes necesarios para llevar a cabo esta síntesis fueron elegidos en base a los conocimientos sobre la afinidad del mercurio y sus compuestos hacia el nitrógeno y el azufre. Para la síntesis de ambos materiales se seleccionó el compuesto NOBE como agente bifuncional, ya que por un lado aporta la función de agente entrecruzante dotando de la consistencia necesaria durante el proceso de polimerización y, por otro lado, actúa de co-monómero, favoreciendo y aumentando el número de uniones disponibles para el mercurio. Los monómeros elegidos en cada caso fueron un derivado de la quinolina, con grupos nitrógeno, y un derivado de la tiourea que contiene átomos de azufre. La búsqueda de componentes de elevada afinidad hacia los compuestos de mercurio es de gran importancia para garantizar el mayor número de uniones específicas.

En función de los resultados obtenidos el material que mejor funcionó para realizar la especiación de mercurio utilizando un sistema de extracción en fase sólida con etapas consecutivas de elución fue el polímero creado a partir del derivado de quinolina. Este hecho puede explicarse basándonos en la fortaleza de los enlaces. Las uniones que se forman entre el S-Hg (para el caso del polímero basado en tiourea) son más fuertes que las formadas por el N-Hg (cuando el monómero deriva de la quinolina). En consecuencia, las condiciones para romper los enlaces en el primer caso son más

extremas pudiendo ocurrir dos cosas: por un lado el uso de disolventes más agresivos puede dañar la estructura interna del polímero disminuyendo la capacidad de retención, o puede que la eliminación del mercurio no sea total, produciéndose problemas de sangrado durante el procedimiento analítico.

Estos primeros resultados sugirieron la opción de utilizar estos materiales combinados con el analizador directo de mercurio DMA-80. La optimización de las rampas de temperatura para la desorción de las especies de mercurio de forma independiente permitió obtener datos semi-cuantitativos de ambas especies de mercurio (Hg^{2+} y CH_3Hg^+). En este caso el material polimérico es destruido tras el proceso de calcinación, por lo que se hizo necesario estudiar la homogeneidad del material y optimización de la mínima cantidad necesaria para llevar a cabo los experimentos. Ambos polímeros presentaron elevada homogeneidad, afinidad y selectividad hacia las especies de mercurio, características muy favorables para la búsqueda de posibles campos de aplicación.

Estos resultados permitieron llevar a cabo la especiación de mercurio en dos configuraciones diferentes: a) mediante elución secuencial en distintas etapas tras el protocolo de SPE y determinación por fluorescencia atómica, y b) utilizando el polímero combinado con el DMA-80. Se ha llevado a cabo la aplicación a muestras de pescado, validando los resultados con éxito mediante el empleo de esas dos metodologías y con el uso de materiales de referencia.

La concentración de mercurio en el agua de mar se encuentra a nivel de ultratrazas por lo que la aplicación de estos materiales como adsorbentes permitió obtener altos factores de pre-concentración sin necesidad de realizar tratamientos previos a la muestra, ya que las sales presentes en el medio no interfirieron en la capacidad de retención. Una ventaja añadida del uso de estos materiales con el agua de mar es su aplicación combinada con el DMA-80, ya que el análisis directo de muestras con elevado contenido en sales provocan la corrosión de la amalgama que lleva incorporada el equipo. Si este tipo de muestras se analizan tras la retención previa del mercurio en el soporte polimérico desarrollado, todos estos problemas mencionados desaparecen.

El desarrollo de estos materiales abre una puerta hacia nuevas metodologías para realizar la especiación de mercurio, disminuyendo los tiempos de análisis y los costes, al menos en una primera fase de identificación y semi-cuantificación de CH_3Hg^+ en muestras sensibles, como puede ser el pescado u otros alimentos siguiendo Directivas de la UE (EUR 25830) que se están implementando. Por otro lado, la posibilidad de pre-concentrar hace que sean materiales óptimos para su aplicación en muestras con muy bajo contenido en mercurio y además estos materiales sirven como sistemas de limpieza para muestras con elevado contenido salino u otros posibles interferentes fácilmente eliminables debido a la elevada afinidad de los adsorbentes por el

mercurio. Por último, su gran capacidad de retención, especialmente en el polímero basado en tiourea así como la dificultad para eluir el mercurio adsorbido, hacen de este material una buena alternativa para aplicarlo como filtros o membranas en zonas contaminadas por mercurio, como pueden ser zonas mineras o residuos tanto industriales como de minería. Esta última posibilidad está en la actualidad siendo explorada en nuestro grupo de investigación.

Desarrollo de plantas transgénicas para aumentar la tolerancia y acumulación de arsénico.

La utilización de plantas para extraer los contaminantes del suelo y de aguas presenta un alto potencial en el campo de la remediación de suelos contaminados. No obstante, todavía se requiere el desarrollo de numerosos estudios que permitan evaluar el efecto acumulador de numerosas plantas respecto a distintos compuestos. En la actualidad, se conoce la capacidad acumuladora de un buen número de especies vegetales, pero los mecanismos implicados en este proceso continúan siendo poco conocidos. En esta tesis hemos proporcionado nuestra experiencia en especiación y determinación de arsénico, para caracterizar nuevas vías implicadas en la desintoxicación mediante la utilización de plantas genéticamente modificadas.

La investigación ha sido llevada a cabo gracias a la colaboración de varias entidades, como ya se ha mencionado anteriormente, focalizando los estudios en nuestro laboratorio en el desarrollo y aplicación de metodologías de análisis de As y sus especies, esenciales para poder entender las modificaciones genéticas desarrolladas.

Los principales mecanismos de desintoxicación del arsénico son: a) reducción de As (V) a As (III), mediante la actividad de las enzimas arseniato reductasas, y b) formación de quelatos con el As (III) por su unión con las fitoquelatinas (PCs), para posteriormente transportarlo al interior de las vacuolas donde queda secuestrado. En el laboratorio de uno de nuestros colaboradores del CNB se identificó una nueva arseniato reductasa en base a la variabilidad natural de la tolerancia a As (V) encontrada en una colección de aislados recolectados en distintas partes del mundo. Hasta ese momento no se había conseguido identificar la auténtica arseniato reductasa y, por tanto, un aspecto esencial de este trabajo consistió en determinar la actividad reductasa, al tratarse de una proteína nueva, distinta de las identificadas anteriormente. La actividad reductasa de esta proteína denominada AtARQ-1 fue evaluada determinando, en presencia de As(V), la producción de As (III) en una cepa mutante arseniato reductasa (*ArsB*) de *Escherichia coli* que expresaba la proteína AtARQ1 de plantas. De esta forma, se comparó la reducción de As (V) medida como producción de As (III) producida por la cepa de *Escherichia coli* silvestre con la detectada en la cepa mutante complementada con la proteína de plantas. Determinamos el contenido de As (III) en plantas silvestres

y mutantes de AtARQ1. La producción de As (III) en bacterias y la falta de acumulación de As (III) en plantas mutantes AtARQ1 proporcionaron la prueba inequívoca de que AtARQ1 codifica para una auténtica arseniato reductasa. El estudio se continuó evaluando la cinética de la reacción de reducción sometiendo tanto a los controles, como a las mutantes a diferentes concentraciones de As (V), acompañado de distintos tiempos de toma de muestra. La tendencia observada fue la misma: al aumentar el tiempo y la concentración de exposición de arsénico en el cultivo, aumentaba la capacidad de reducción. El último paso fue evaluar la competencia existente entre el As (V) y el fosfato (Pi), mediante el cálculo de la constante de Michaelis-Menten (Km), característica de las reacciones enzimáticas, siendo inversamente proporcionales. Valores elevados de Km implican una disminución de la afinidad de la enzima hacia el sustrato. Se demostró la competencia entre ambos sustratos ya que al aumentar la concentración de fosfato también aumentaba la concentración de As (III) en las líneas mutantes, lo que no ocurría en las plantas control. De este modo, quedó patente la existencia de un nuevo tipo de proteínas AtARQ1 responsables de la variabilidad genética natural, para demostrar su papel crítico de un nuevo grupo de arseniato reductasas.

Además, se ha determinado también el papel relevante de la fitohormona citoquinina (ck) en la tolerancia a As (V) al demostrar que plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan una citoquinina oxidasa (ckx1) y que por tanto poseen los niveles endógenos de cks disminuidos, muestran un fenotipo extraordinario de tolerancia hacia el As (V). Para ello, se comparó la inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de As (V), con relación al crecimiento de las raíces en su ausencia. Esta observación sugiere que las citoquininas reprimen la respuesta de desintoxicación en plantas. De acuerdo con esta observación, en este trabajo hemos demostrado que una exposición a As (V) disminuye los niveles endógenos de ck, lo que conduce a la activación de los mecanismos de tolerancia al arsénico, incluyendo la inducción de la actividad arseniato reductasa y el incremento de las PCs y el glutatión mediante la activación de la expresión del *AtARQ1* y de los genes implicados en la biosíntesis de PCs. Una característica de las plantas que expresan ckx1 es el incremento de la biomasa radicular posiblemente por la hiperactivación de los meristemos radiculares. La capacidad de estas plantas para tolerar As (V) abre la posibilidad de que mediante la manipulación de los niveles endógenos de cks se puedan conseguir plantas con una mayor capacidad de extracción y acumulación de arsénico al tener una mayor biomasa de raíces y poseer los mecanismos de tolerancia hiperactivados, incrementando los niveles de grupos tioles, responsables del secuestro de As (III). Además, hemos visto que este mecanismo también se activa en otros tipos de especies vegetales como la planta del tabaco. Este trabajo sugiere posibles aplicaciones futuras en el campo de la fitorremediación de suelos contaminados por arsénico.

Estudios de bioconcentración y distribución de metales y nanopartículas en larvas de pez cebra

Los estudios de bioconcentración y toxicidad mediante el empleo de organismos vivos suponen un elevado coste y tiempo experimental. Dentro del trabajo desarrollado en esta tesis se han empleado larvas del pez cebra como organismo modelo por las numerosas ventajas que ofrece y que ya han sido expuestas en esta tesis. Los ensayos de bioconcentración han sido realizados mediante una modificación al Test 305 de la OECD. Esta alternativa supone el reemplazo de peces adultos por eleuteroembriones (larvas) del pez cebra, disminuyendo considerablemente el tiempo del estudio y los costes asociados. Por consiguiente, se pueden ensayar muchos más parámetros y conseguir una información más completa en un tiempo razonable.

Los estudios de bioconcentración realizados se han basado en ensayos comparativos ante los posibles efectos de varios metales y de los quantum dots (CdSe/ZnS). Se han evaluado por separado o conjuntamente; el cálculo de los Factores de Bioconcentración en estas situaciones nos proporciona más información sobre los mecanismos de acumulación, fundamentalmente si pueden existir efectos sinérgicos o de inhibición cuando en el medio acuático conviven más de uno de ellos conjuntamente, lo que se aproxima más a las situaciones en el medioambiente. Sin embargo, para poder realizar estos ensayos conjuntos comparativos, es necesario tener información previa de cada uno de ellos por separado. Una de las informaciones necesarias antes de realizar la exposición a los contaminantes es conocer el LC_{50} de la sustancia o sustancias a estudiar, ya que el Test 305 establece que la exposición se realice, siempre que sea posible, en un intervalo del 0.1 al 1% del LC_{50} . En el trabajo de exposición de las larvas de pez cebra a los Quantum Dots fue necesario realizar previamente una correcta caracterización de estas nanopartículas para establecer exactamente la concentración de iones Cd presentes en dichas nanopartículas para poder compararlo con el Cd^{2+} así como su estabilidad en el medio de exposición y tamaño, observando problemas de aglomeración en las condiciones de exposición del Test. Ello nos obligó a introducir una agitación moderada pero constante de las larvas, con la menor perturbación en su crecimiento, durante todo el período de exposición para asegurar así el contacto entre las nanopartículas y las larvas expuestas. Tal y como se concluye en el trabajo publicado en este ensayo, los BCF experimentales calculados fueron comparables con los BCF teóricos extraídos de la base de datos japonesa dotada con acreditación internacional METI-NITE, obteniendo valores de biodegradación y bioconcentración de las sustancias químicas, existiendo una acumulación del Cd^{2+} en las larvas. Sin embargo, en el caso de los QDs, el BCF experimental obtenido fue próximo a 1, lo que implica que no se dio bioconcentración de estas nanopartículas en las condiciones establecidas. No se ha podido encontrar ningún valor publicado para comparar estos resultados por lo que se trata de los primeros valores disponibles en este tipo de ensayos con estas nanopartículas.

El ensayo de bioconcentración realizado con una mezcla pre-establecida de metales, formada por plata, arsénico, cadmio y metilmercurio, ha partido de trabajos publicados con anterioridad por nuestro grupo de investigación en el que se estudió cada metal por separado. Las premisas de exposición fueron las mismas, considerando los LC₅₀ de cada metal por separado y realizando la exposición exclusivamente al 1% del LC₅₀ como nivel más elevado de los permitidos por el Test 305. Al comparar los valores de BCF obtenidos para cada metal por separado y en la mezcla, que han sido reflejados en la Tabla que aparece debajo se observan claras discrepancias, como en el caso del As, con un aumento de 7 veces el BCF y para la Ag en el que se observó un incremento del 25%. Para el CH₃Hg⁺ se mantuvo prácticamente igual, dado que ya es un valor muy elevado incluso cuando la exposición es individual. El único que ve reducido su BCF respecto a sus datos individuales es el Cd, resultados que coinciden con experimentos encontrados en la bibliografía. Esta inhibición puede ser debida a la presencia de arsénico y de iones de calcio y sodio en el medio.

	QDs	Cd	Ag	As	CH ₃ Hg
C _{nominal} (µg·L ⁻¹)	500	10	0.1	50	25
BCF _{teórico} METI-NITE	---	310	250	4	1800
BCF _{exp} Individual	5	350	233	2.2	2333
BCF _{exp} Mezcla	---	160	312	15.4	2967

Los resultados obtenidos en los estudios de bioconcentración han sido reforzados mediante la realización de una distribución espacial de cada uno de ellos en el interior de la larva, aplicando la técnica de LA/ICP-MS. Para poder ver la distribución de los distintos elementos en el interior de las larvas, fue necesario realizar una optimización previa del tratamiento de muestra, ya que debido al pequeño tamaño de las muestras su manipulación es complicada y se pueden producir pérdidas importantes, tal y como se ha discutido en el apartado de Resultados, así como de las condiciones óptimas del láser acoplado al ICP/MS para la obtención de imágenes. Este desarrollo instrumental fue el objeto de mi estancia de tres meses en el LCABIE de Pau, Francia y ha permitido poner en funcionamiento un acoplamiento similar entre un láser CETAC LSX-500 y un ICP/MS HP 4500 en nuestro laboratorio de investigación.

Las imágenes mostraron de forma nítida la acumulación del cadmio, y ésta se producía de forma significativa en los ojos; sin embargo, los QDs, tienden a quedarse adheridos a la superficie, pudiendo penetrar una pequeña cantidad de cadmio libre, tras la

posible degradación de los QDs. Si se observa la distribución espacial resultante de la mezcla de metales, podemos comprobar cómo el Cd continúa acumulándose en la zona de los ojos, no estando interferida por la presencia de otros contaminantes en el medio. El metilmercurio se acumula en grandes cantidades a lo largo de todo el tubo digestivo. En el caso del arsénico y la plata, con las imágenes no es posible detectar ninguna acumulación, debido a los bajos valores experimentales obtenidos para el arsénico y la baja concentración de exposición de la plata. En ambos casos, es necesario llevar a cabo más estudios modificando las condiciones de exposición, o realizando una optimización de la instrumentación que nos permita mejorar los límites de detección, ya que los BCFs indican que sí ha habido entrada de ambos iones en las larvas, así como acumulación en los tejidos.

La combinación de ambas herramientas, bioconcentración y distribución espacial, son totalmente complementarias para la evaluación de algunos parámetros que llevan a definir la toxicidad de determinadas sustancias presentes en el medio acuático y cómo pueden afectar a los seres vivos, ofreciendo además información sobre el comportamiento de cada contaminante de manera separada pero también conjuntamente con otros.

Para terminar, resaltar nuevamente que el trabajo que se ha mostrado a lo largo de esta tesis engloba distintos campos relacionados todos ellos con la necesidad de aumentar el conocimiento que se tiene de los efectos que provoca la contaminación en el medioambiente; los estudios realizados permiten plantear mecanismos y alternativas para hacer frente a los problemas derivados de la misma. Así, por ejemplo, los trabajos realizados con los polímeros para mercurio abren la posibilidad de ampliar el campo de aplicaciones hacia suelos y muestras biológicas, además de realizar el escalado de estos materiales tras un estudio económico viable para su posible aplicación en sitios contaminados con este metal. De hecho, se han iniciado contactos con otros centros de investigación, así como con empresas para intentar comercializar estos materiales, registrados en la Oficina Española de Patentes y Marcas. En cuanto a los estudios realizados con las plantas acumuladoras puede aprovecharse en el área de la fitorremediación; los resultados obtenidos abren también opciones para poder aplicarse a otros elementos, como pueden ser mercurio y cadmio. Esta es una vía que se está explorando para seguir manteniendo la colaboración multidisciplinar comenzada con esta tesis. En último lugar, los mecanismos de bioacumulación continúan siendo un enigma, siendo necesario el empleo de organismos vivos, en nuestro caso el pez cebra, para poder comprender qué ocurre en su interior cuando se exponen a medios más reales y complejos, aumentando su dificultad de entendimiento.

El objetivo final de todos estos estudios es poder plantear la metodología desarrollada con las larvas del pez cebra como una alternativa a la experimentación con peces adultos por todas las ventajas que ya han quedado claramente expuestas. Aún queda mucho camino por recorrer, pero el número de datos de los que ya se dispone en el grupo de investigación empieza a ser relevante para conseguir dicho objetivo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la memoria de esta tesis han permitido cumplir con los objetivos propuestos. Las conclusiones más relevantes quedan resumidas a continuación:

- Se han sintetizado nuevos materiales poliméricos mediante polimerización por precipitación con elevada selectividad hacia el mercurio y sus especies, sin necesidad de utilizar compuestos de mercurio durante el proceso de polimerización, como ocurre con los polímeros de impronta molecular. Para ello, se han sintetizado también los monómeros con afinidad a formar enlaces con el mercurio, mediante uniones S-Hg o N-Hg. Estos materiales han sido exhaustivamente caracterizados, obteniendo una retención cuantitativa hacia el mercurio y una elevada selectividad frente a otros elementos. El desarrollo de estos materiales ha permitido su aplicación como técnicas alternativas a las cromatográficas para la especiación de mercurio, mediante el empleo de ambos materiales en diferentes configuraciones. Por un lado, se ha conseguido la elución secuencial de las especies de mercurio (Hg^{2+} y CH_3Hg^+) mediante extracción en fase sólida, utilizando como adsorbente el polímero obtenido con un derivado de la 8-Hidroxiquinolina. Por otro lado, se ha propuesto una configuración utilizando el polímero derivado de la tiourea con el analizador directo de mercurio DMA-80 para la determinación semi-cuantitativa de las especies antes mencionadas. Por último, el análisis de Hg a nivel ultra-traza en muestras de elevado contenido salino ha sido llevado satisfactoriamente con estos materiales.
- Los estudios de bioacumulación empleando larvas del pez cebra han permitido el cálculo y comparación de los BCFs de algunas especies de metales como son As, Cd, Ag y CH_3Hg^+ , estudiados individualmente o todos conjuntamente para intentar comprender el comportamiento y los mecanismos de bioacumulación de estos metales cuando se encuentran formando una mezcla en el medio de exposición o de forma individual. Del mismo modo, se han observado las diferencias en la capacidad de bioacumulación cuando el Cd se encuentra en el medio en forma iónica o como nanopartículas (QDs), observando claras diferencias según se encuentre en una u otra forma. En este mismo punto, la técnica LA-ICP/MS nos ha permitido obtener una imagen espacial de las larvas expuestas a los elementos mencionados, pudiendo determinar qué parte de la larva es más susceptible a la bioacumulación y cuáles de los elementos

expuestos eran los más acumulados. Los resultados obtenidos se correspondieron con los BCFs obtenidos experimentalmente.

- Gracias a la colaboración entre distintos departamentos y a un trabajo multidisciplinar, se han obtenido plantas transgénicas hiperacumuladoras de arsénico a partir de *Arabidopsis thaliana* como modelo. Estas modificaciones genéticas han mostrado un aumento en la tolerancia hacia el As (V). Al mismo tiempo se ha descubierto una nueva arseno reductasa capaz de reducir As (V) a As (III), así como la implicación que las Citocinasas tienen en el proceso de desintoxicación en las plantas. Estos estudios han permitido obtener el mismo efecto en la planta del tabaco, siendo una alternativa planteable para la fitoremediación de suelos contaminados por arsénico.

CONCLUSIONS

The results obtained in the PhD have enabled us to satisfy with the proposed aims. The main conclusions are summarized below:

- New polymeric materials have been synthesized by precipitation polymerization. These materials have showed high selectivity towards mercury and mercury species, without the need to use mercury compounds during the polymerization reaction, to the principle of the molecularly imprinted ones. Monomers have also been synthesized to favor the binding with mercury by S-Hg or N-Hg interactions. These materials have been thoroughly characterized: quantitative retention and high selectivity versus other elements has been achieved. The results are supported by two patents. These materials have been employed as alternative techniques to chromatographic ones in order to apply mercury speciation by using both materials in different configurations. On the one hand, sequential elution of mercury species (Hg^{2+} y CH_3Hg^+) has been achieved through solid phase extraction, using as adsorbent the 8-Hidroxyquinolone derivate. On the other hand, tandem configuration has been proposed using the direct mercury analyzer (DMA-80) with the thiourea-based polymer. This combination allowed the semi-quantitative mercury species analysis. Also, analysis of mercury in high saline samples, at ultra-trace concentrations, has been applied.
- Bioaccumulation studies have been performed by using zebra fish larvae for calculation and comparison of BCFs of some metals such as As, Cd, Ag and CH_3Hg^+ , after individual or altogether exposition. The results showed some differences that have been already discussed. Alike, different bioaccumulation capacity has been observed for cadmium depending on the form in which is present: as ionic cadmium or as nanoparticles (QDs). Finally, LA-ICP/MS technique has allowed to a spatial image of the larvae exposed to the mentioned elements. The images determined where the bioaccumulation mostly occurs and for which elements, being in good agreement with the experimental BCFs values.
- The collaboration between different departments in a multidisciplinary work has led to obtain transgenic hyperaccumulator plants for arsenic by using *Arabidopsis thaliana* as *in vivo* model organism. These genetic modifications have showed an increase of As (V) tolerance. At the same time, a new enzyme arseno reductase has been discovered (this enzyme can reduce As (V) to As

(III) as well as the involvement of Cytokinins in the detoxification process in plants. Both mechanisms are involved in the tolerance of arsenic and the detoxification capacity. These studies have been allowed to obtain the same effect in tobacco plant, offering an attractive alternative for phytoremediation of contaminated lands.

Anexo: Patentes

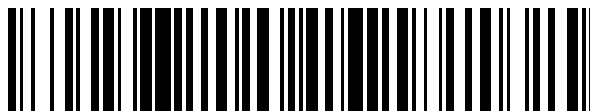
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 156**

21 Número de solicitud: 201400535

51 Int. Cl.:

C07D 215/32 (2006.01)

C08F 226/06 (2006.01)

G01N 33/20 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01)

C02F 1/62 (2006.01)

C02F 5/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

07.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.01.2016

Fecha de la concesión:

19.04.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.04.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**C/ Donoso Cortés, 65, 1ª Planta
28015 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

MUÑOZ OLIVAS, María Riansares;

CÁMARA RICA, Carmen;

MANCHEÑO REAL, María José y

ZARCO FERNÁNDEZ, Sonia

74 Agente/Representante:

TIRADO FERNÁNDEZ, José Francisco

54 Título: **Material polimérico para la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio**

57 Resumen:

Material polimérico para la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio.

El mercurio es un elemento pesado de elevada toxicidad debido principalmente a su elevada biodisponibilidad y bioacumulación en el organismo. Esta acumulación depende de su forma química siendo las especies orgánicas, como el metilmercurio, las que representan un mayor peligro para la salud, lo que hace necesario disponer de metodologías analíticas sencillas controlar el mercurio en los alimentos.

La presente invención muestra un nuevo material polimérico para la especiación y análisis selectivo de mercurio permitiendo realizar una separación entre el mercurio inorgánico y el metilmercurio en muestras medioambientales y alimentarias.

ES 2 556 156 B2

DESCRIPCIÓN

Material polimérico para la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio

Sector de la Técnica

- 5 La presente invención pertenece al campo de métodos analíticos para el análisis de mercurio. De forma más concreta, se refiere a la fabricación de materiales poliméricos para la pre-concentración y determinación de especies de mercurio, en especial, en muestras medioambientales y alimentos.

10 Estado de la técnica

- El mercurio es un elemento pesado de elevada toxicidad debido principalmente a su elevada biodisponibilidad y bioacumulación en el organismo. Esta acumulación depende de su forma química siendo las especies orgánicas, como el metilmercurio, las que representan un mayor peligro para la salud. La legislación vigente limita el
15 contenido de mercurio en alimentos, especialmente pescados, lo que hace necesario disponer de metodologías analíticas sencillas controlar el mercurio en los alimentos.

También la especiación y análisis de las distintas especies de mercurio en muestras medioambientales constituye hoy en día un tópico de gran interés.

20

- Se han desarrollado numerosos procedimientos y técnicas analíticas en los últimos años (Noal, E. M. et al. *Chem. Rev.* 108 (2008) 3443-3480; Liu, z. et al. *Anal. Chem.* 81(2012) 10170-10174; Gao, W. et al. *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 126-132). Entre los métodos de análisis más extendidos pueden citarse el uso de Espectroscopía
25 de Absorción Atómica (AAS) (Ignacio, L.G. et al. *Anal. Chim. Acta* 743 (2012) 69-74), Espectrometría de Fluorescencia (AFS) (Ai, X. et al. *Analyst* 138 (2013) 3494-350; Da Silva, M.J. et al. *Anal. Chim. Acta* 667 (2010) 43-48), Cromatografía Líquida (LC) (Gao, Z. et al. *Chim. Acta* 702 (2011) 50-55; Yin, Y.G. et al. *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1575-1578), Cromatografía de Gases (GC) acoplada a diversos
30 detectores (Carro, M. et al. *Chromatographia* 56 (2002) 733; Logar, M. et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002)1015; Berzas Nevado, J. et al. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4545-4551; Mishra, S. et al. *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198),

Electroforesis capilar (CE) (Chen, C. et al. *Anal. Methods* (2012) 1185-1191; Lai, E.P. et al. *Anal. Chim. Acta* 264 (1998) 63-74; Li, Y. et al. *Electrophoresis* 26 (2005) 661-667) o ICP-MS (de Souza, S.S. et al. *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 79-83; Debeljak, M. et al. *Anal. Chim. Acta* 787 (2013) 155-162). En general, el uso de estas
5 técnicas requiere procedimientos complejos de tratamiento de la muestra.

Existen otras aproximaciones a la especiación de mercurio entre las que cabe destacar el diseño de sensores fluorescentes (FL) utilizando “quantum dots” (QDs), “metal-organic dots” (MOFs) o nanopartículas de oro (AuNp), entre otros (Yuan, C. et al.
10 *Anal. Chem.* 84 (2012) 9792–9801; Wang, H. et al. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9021–9028; Park, M. et al. *Chem. Commun.* 46 (2010) 4478–4480; Lin, Y.W. et al. *Analyst* 136 (2011) 3323–3328; Wang, C. I. et al. *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 124–130; Ma, C. et al. *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 69–78; Xu, F. et al. *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 240–245; Sener, G. et al. *Anal. Chem.* 86 (2014) 514–520; An, J. H. et al. *ACS Nano*
15 7 (2013) 10563–10571).

La determinación directa de dichas especies de una manera sencilla y utilizando técnicas que proporcionen una elevada sensibilidad sigue siendo de interés ya que son numerosos los problemas asociados prácticamente a todas las metodologías
20 propuestas. Su sensibilidad y selectividad normalmente son insuficientes para bajos niveles de concentración de analitos.

En este sentido, la utilización de polímeros impresos moleculares (MIPs) es una técnica novedosa para el reconocimiento de especies ya que ofrece una serie de
25 ventajas analíticas: permiten realizar un *clean-up* de la muestra de forma rápida y eficaz, permiten preconcentrar los analitos que se encuentran a bajas concentraciones, son muy selectivos con el/los analito/s de interés, su síntesis es sencilla y de bajo coste, pueden ser robustos y duraderos y pueden ser reutilizables. Sin embargo, aunque se utilizan ampliamente para el reconocimiento de moléculas orgánicas no sucede lo mismo para el reconocimiento de iones y/o especies metálicas. Hasta la
30 fecha, son muy pocos los polímeros desarrollados capaces de retener metales y menos

con capacidad selectiva de reconocer distintas especies de los mismos. Por ello, el desarrollo de materiales selectivos sigue siendo de gran interés.

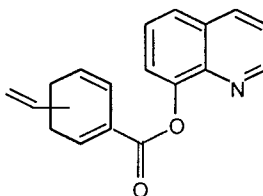
En la presente invención se presenta un nuevo polímero sintetizado a través de un proceso de polimerización por precipitación y que resulta selectivo hacia el mercurio permitiendo realizar una separación entre el mercurio inorgánico y el metilmercurio constituyendo, por tanto, una herramienta para facilitar la especiación de Hg en laboratorios de rutina para su especiación en alimentos. El polímero desarrollado puede ser utilizado también en medios acuosos.

10

Descripción detallada de la invención

El material polimérico se sintetiza mediante polimerización radicalaria utilizando como reactivos un monómero derivado de 8-hidroxiquinolina de Fórmula I (vinilbenzoatos de quinolin-8-ilo), un agente entrecruzante y un iniciador de la polimerización en presencia de un disolvente.

15



20

I

El polímero así obtenido se caracteriza mediante el estudio en cartuchos de extracción en fase sólida (procedimiento MIPSE), optimizando previamente todas las etapas.

25

La cuantificación del mercurio se lleva a cabo mediante la técnica CV-AFS (Cold Vapour-Atomic Fluorescence Spectroscopy).

El polímero obtenido posee elevada afinidad hacia el mercurio (en sus distintas formas químicas) y un alto factor de preconcentración. Presenta alta eficacia hacia la retención de especies tanto de mercurio inorgánico como metilmercurio tanto en matrices salinas como el agua del mar, sin necesidad de tratamiento previo de la muestra. Permite, por tanto, la especiación de metilmercurio y mercurio inorgánico

30

por elución secuencial de las especies y constituye una herramienta novedosa para facilitar la especiación de Hg en laboratorios de rutina para su especiación en alimentos y muestras de interés mediambiental.

5 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el esquema general de la especiación de mercurio inorgánico, Hg (II) y metilmercurio, MeHg, siguiendo el procedimiento MISPE: 1) acondicionamiento, 2) carga de la muestra, 3) lavado, 4) elución de mercurio inorgánico, Hg (II) y 5) elución de metilmercurio, MeHg.

10

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

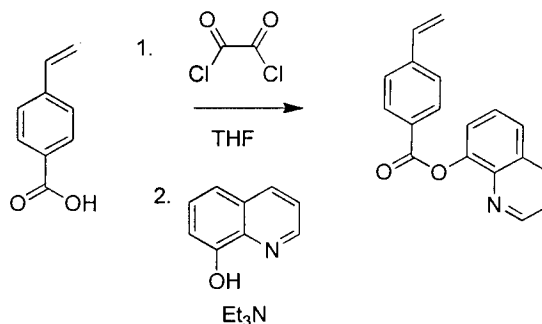
15 Ejemplo 1

En este ejemplo de muestra la síntesis del monómero *p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo (Esquema I).

Sobre una disolución de ácido *p*-vinilbenzoico (830 mg, 5.6 mmol) en THF anhidro
20 (15 mL) se añade DMF anhidra (12 gotas). La mezcla se enfría a 0°C y se añade cloruro de oxalilo (0.7 mL, 8.02 mmol) gota a gota. La mezcla se agita 3 h a 20°C, a continuación se elimina el disolvente y el exceso de cloruro de oxalilo a vacío. El residuo se disuelve en THF anhidro (15 mL), y se añade 8-hidroxiquinolina (0.82 g, 5.6 mmol) y trietilamina (1mL, 7.2 mmol). La mezcla se agita durante 4 h a 20°C.
25 Posteriormente, se extrae con diclorometano, se lava con agua y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se elimina a vacío y el sólido obtenido se purifica por cromatografía obteniéndose un sólido blanco (0.78 g, 50%).P.f.: 148-150 °C.

¹H RMN (CDCl₃): 5.43 (d, *J*= 11 Hz, 1H), 5.92 (d, *J*= 17.7 Hz, 1H), 6.82 (dd, *J*= 17.7, *J*= 11 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J*= 8.3, *J*= 4.2 Hz, 1H), 7.57 (m, 4H), 7.76 (m, 1H), 8.19 (dd, *J*= 8.3 Hz, *J*= 1.7 Hz, 1H), 8.31 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H), 8.89 (dd, *J*= 4.3, *J*= 1.7 Hz 1H).¹³C RMN (CDCl₃): 165.2 (C=O), 150.6 (CH), 147.8 (Cq), 142.5 (CH), 141.4 (Cq), 136.1 (Cq), 135.9 (CH), 130.9 (CH), 129.6 (Cq), 128.6 (Cq), 126.3 (CH), 126.2 (CH), 125.9 (CH), 121.7 (CH), 121.6 (CH), 116.7 (CH₂). IR (KBr): 1736, 1604, 1499, 1266, 1234, 1173, 1096 cm⁻¹. MS (EI)

m/z: 275.09 (M^+ , 66%), 132.05 (52%), 131.05 (100%), 103.05 (73%), 77.04 (68%). Análisis elemental: C, 78.53; H, 4.76; N, 5.09 $C_8H_{13}NO_2$ requiere C, 78.60; H, 4.73; N, 5.13.



5

Esquema I

Ejemplo 2

En este ejemplo se representa la síntesis del polímero de fórmula IV (Esquema II)

10

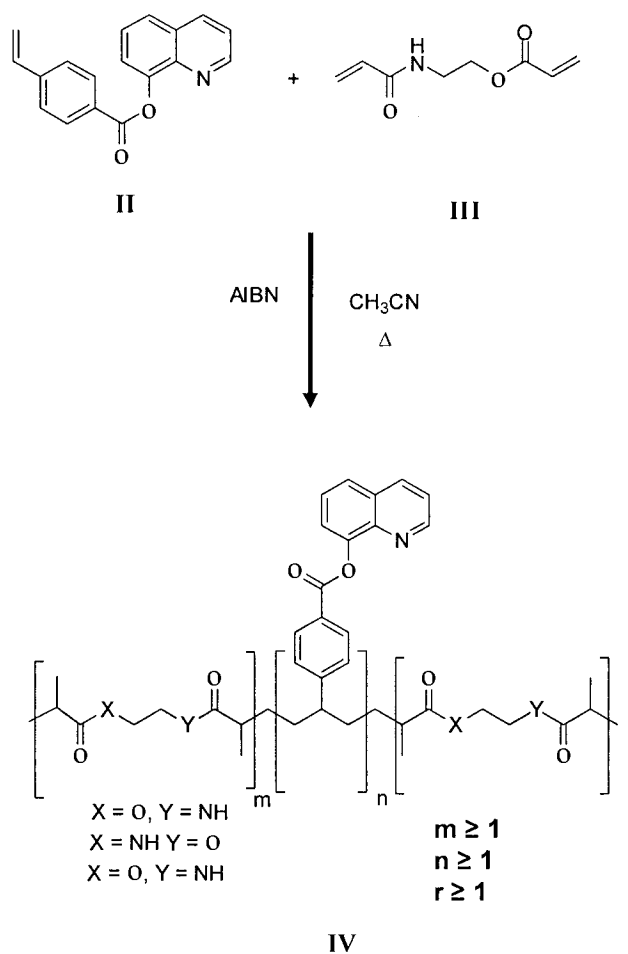
El material polimérico se sintetiza mediante polimerización radicalaria utilizando como reactivos un monómero de Fórmula II (*p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo), un agente entrecruzante de Formula III (acrilato de 2-acriloilamidoetilo, NOBE) y un iniciador de la polimerización (2,2'-azobis-isobutironitrilo, AIBN) en presencia de un

15 disolvente (acetonitrilo).

15

La polimerización se lleva a cabo en botes de topacio en atmósfera de argón, utilizando una placa calefactora con agitación, manteniendo una temperatura de 65°C durante 24 h. Se introducen 0,13 mmol (35 mg) del monómero 1 disueltos en 4 mL de

20 acetonitrilo (pureza HPLC), 3 mmol de NOBE (600 mg) y posteriormente el iniciador (AIBN). La mezcla se agita a 65 °C durante 24 h. El precipitado obtenido se pesa, obteniendo alrededor de 600 mg de un sólido blanco en cada proceso de polimerización.



Esquema II

Ejemplo 3

- 5 En este ejemplo se muestra la caracterización del polímero del ejemplo 2 mediante procedimiento MIPSE (Figura 1).

Se utiliza el material polimérico como soporte en cartuchos de vidrio de 6 mL dotados con fritas de teflón de 0,22 micras. La cantidad depositada en los cartuchos es de 50 mg de polímero, llevándose a cabo las siguientes etapas del procedimiento.

- 10
- Acondicionamiento del material con 5 mL de HCl 2M en metanol y 5 mL H₂O Milli-Q
 - Carga: 1mL de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg (II) y CH₃Hg, en agua, tanto individual como conjuntamente.
- 15
- Lavado: con 1 mL de acetonitrilo para eliminar posibles interferentes y las uniones inespecíficas.

- Elución: en el caso de sólo cargar mercurio inorgánico, su elución se realiza con 5 mL de HCl 2M en metanol; si se ha cargado con metilmercurio, la elución se realiza con 5 mL de NaClO al 20% en 1M HCl. Y en el caso de cargar ambos analitos se lleva a cabo la elución secuencial de las especies (eluyendo primero el mercurio inorgánico).

Ejemplo 4

Selectividad del polímero del ejemplo 2 hacia el mercurio.

- 10 Los estudios de reactividad cruzada se realizan siguiendo el procedimiento MIPSE utilizando otros elementos que están presentes en el medio ambiente, como son As, Cd y Pb y permiten demostrar la elevada selectividad de este material hacia el mercurio. Se consigue un factor de preconcentración de 40 aplicado en agua de mar para mercurio inorgánico y orgánico, teniendo una eficiencia de recuperación del
- 15 100% para el caso del mercurio inorgánico y del 80% para el metilmercurio. Además, el procedimiento MIPSE permite diferenciar entre ambas especies en etapas consecutivas de elución, obteniendo una separación secuencial.

Ejemplo 5

- 20 Se muestra la aplicación del material polimérico del ejemplo 2 a muestras reales biológicas o de pescados.

En primer lugar, se liofilizan las muestras de pez espada y atún, previamente compradas en el supermercado. Se realiza una extracción con HCl 5M durante 30

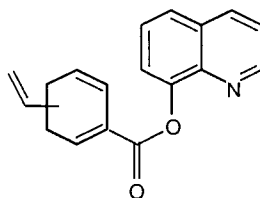
25 minutos en un baño de ultrasonidos; posteriormente se centrifuga para recoger el sobrenadante, siendo el extracto de interés. Antes de realizar el procedimiento MISPE, el extracto se diluye para que su concentración final sea de 2,5 M de HCl. Tras ello se procede a realizar el procedimiento descrito anteriormente.

- 30 De este modo se puede evaluar el contenido de metilmercurio directamente, sin necesidad de preconcentrar el extracto. El procedimiento es validado mediante el análisis de un material de referencia BCR-646 (metilmercurio de atún).

REIVINDICACIONES

1. Monómero derivado de 8-hidroxiquinolina de fórmula I:

5

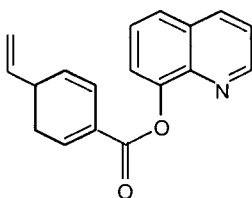


10

I

2. Monómero derivado de 8-hidroxiquinolina (*p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo), según reivindicación 1, de fórmula II:

15



20

II

3. Método de obtención del monómero *p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo, según reivindicación 2, a partir de ácido *p*-vinilbenzoico y 8-hidroxiquinolina.
4. Método de obtención del monómero *p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo, según reivindicación 3, caracterizado porque se lleva a cabo en dos etapas:
- a) Disolución de ácido *p*-vinilbenzoico en THF anhidro y posterior adición de DMF anhidra y cloruro de oxalilo.
- b) Eliminación del disolvente y el exceso de cloruro de oxalilo, disolución en THF anhidro y adición de 8-hidroxiquinolina y trietilenamina. El sólido blanco obtenido se recupera y purifica.
5. Material polimérico que comprende el monómero *p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo.

6. Material polimérico, según reivindicación 5, que comprende el monómero *p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo y un agente entrecruzante.
7. Material polimérico, según reivindicación 6, caracterizado porque el agente entrecruzante es acrilato de 2-acriloilamidoetilo (NOBE).
8. Método de obtención de material polimérico, según reivindicaciones 5, y 6, caracterizado porque comprende:
 - Disolver el monómero (*p*-vinilbenzoato de quinolin-8-ilo) en un disolvente porógeno.
 - Añadir un agente entrecruzante
 - Añadir un iniciador de polimerización
 - Recuperar el producto obtenido
9. Método de obtención de material polimérico, según reivindicación 8, donde el agente entrecruzante es 2-acriloilamidetilo (NOBE).
10. Método de obtención de material polimérico, según reivindicaciones 8 y 9, donde el iniciador de la polimerización es AIBN.
11. Método de obtención de material polimérico, según reivindicaciones 8, 9 y 10, donde el disolvente porógeno es acetonitrilo.
12. Método de obtención de material polimérico, según reivindicaciones 8 a 11, donde la polimerización se lleva a cabo por precipitación.
13. Uso del material polimérico reivindicado para la preconcentración y especiación selectiva de especies de mercurio inorgánico y orgánico.
14. Uso del material polimérico, según reivindicación 13, donde las especies de mercurio provienen de aguas naturales.
15. Uso del material polimérico, según reivindicación 13, donde las especies de mercurio provienen de alimentos.

16. Uso del material polimérico, según reivindicación 15, donde las especies de mercurio provienen de pescados.

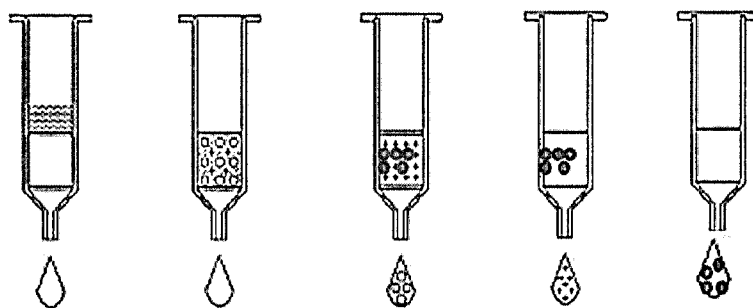


Figura 1



②① N.º solicitud: 201400535

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	H. ZHANG et al., "8-Hydroxyquinoline benzoates as highly sensitive fluorescent chemosensor for transition metal ions", Organic Letters, 2005, vol. 7, nº 19, páginas 4217-4220.	1-16
A	Y. CHENG et al., "Azo dyes based on 8-hydroxyquinoline benzoates: Synthesis and application as colorimetric Hg ²⁺ selective chemosensors", Dyes and Pigments, 2008, vol. 76, páginas 775-783.	1-16
A	Z.-X. HAN et al., "A ratiometric chemosensor for fluorescent determination of Hg ²⁺ based on a new porphyrin-quinoline dyad", Spectrochimica Acta Part A, 2009, vol. 72, páginas 1084-1088.	1-16
A	US 20100128556 A1 (E. ROSENBERG et al.) 24.05.2012, todo el documento.	1-16
A	US 20080044913 A1 (S. K. CHANG et al.) 21.02.2008, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.10.2014

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D215/32 (2006.01)

C08F226/06 (2006.01)

G01N33/20 (2006.01)

G01N21/75 (2006.01)

C02F1/62 (2006.01)

C02F5/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08F, C07D, G01N, C02F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NLP, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.10.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	H. ZHANG et al., Organic Letters, 2005, vol. 7, nº 19, pgs. 4217-4220	2005
D02	Y. CHENG et al., Dyes and Pigments, 2008, vol. 76, pgs. 775-783	2008
D03	Z.-X. HAN et al., Spectrochimica Acta Part A, 2009, vol. 72, pgs. 1084-1088	2009
D04	US 2010/0128556 A1 (E. ROSENBERG et al.)	24.05.2012
D05	US 2008/0044913 A1 (S. K. CHANG et al.)	21.02.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a unos compuestos monómeros vinílicos derivados de 8-hidroxiquinolina de fórmulas I y II, al método de obtención de los mismos, al material polimérico que comprende el monómero II y al método de obtención de dicho material polimérico. La invención también se refiere al uso de dicho material polimérico para la concentración y separación selectiva de especies de mercurio orgánico y/o inorgánico procedente de aguas naturales o alimentos.

El documento D01 divulga unos compuestos derivados benzoatos de 8-hidroxiquinolina que actúan como sensores fluorogénicos altamente selectivos para la detección de metales de transición como Hg^{2+} y Cu^{2+} en agua. En particular se divulgan los compuestos 3a-e que son estructuralmente parecidos a los monómeros I y II de la invención pero no tienen un sustituyente vinilo en el resto benzoato de la posición 8 del sistema de hidroxiquinolina.

El documento D02 se refiere a la síntesis y aplicación de compuestos 5-azo derivados de 8-hidroxiquinolina benzoatos como sensores químicos para la detección colorimétrica selectiva de iones Hg^{2+} . En este caso son compuestos benzoatos de 8-hidroxiquinolina con varios grupos fenilazo p-sustituídos en la posición 5 del sistema de hidroxiquinolina que en ningún caso es un resto vinilo.

El documento D03 divulga un compuesto benzoato 8-hidroxiquinolina con un anillo de porfirina situado en la posición 4 del anillo bencénico. Este compuesto tiene actividad como sensor fluorescente radiométrico y altamente selectivo para el reconocimiento de iones Hg^{2+} en mezclas de agua-etanol.

El documento D04 divulga unos compuestos derivados de 5-cloro y 5-sulfonil-8-hidroxiquinolina que se enlazan covalentemente a un gel composite de sílice y polialilmina. Estos composites modificados se utilizan para la separación de metales de transición divalentes y trivalentes, entre otros mercurio, contenidos en efluentes acuosos procedentes de extracciones mineras.

El documento D05 divulga la obtención de derivados de 8-hidroxiquinolina acetamida y tioacetamida que tienen aplicación para la detección selectiva de iones Hg^{2+} en sistemas acuosos químicos y biológicos.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que hagan referencia a compuestos derivados de 8-hidroxiquinolina con un sustituyente vinilbenzoato que permita obtener un material polimérico mediante polimerización del mismo en presencia de un agente entrecruzante. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir la utilización de estos monómeros y polímeros derivados de p-vinilbenzoato de 8-hidroxiquinolina como materiales para la detección selectiva de mercurio orgánico o inorgánico procedente de aguas naturales o en alimentos.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1-16 se consideran nuevas y con actividad inventiva y aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.



Nº SOLICITUD: P 2 0 1 5 0 0 7 0 4	
FECHA Y HORA DE ENTRADA EN OEPM: 30-SEP'15 11:48	
FECHA Y HORA DE ENTRADA EN LUGAR DISTINTO A LA OEPM:	
LUGAR DE PRESENTACIÓN	CODIGO

INSTANCIA DE SOLICITUD

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD	
(2) TIPO DE SOLICITUD: <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> ENTRADA EN FASE NACIONAL DE SOLICITUD PCT	(3) EXPEDIENTE PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD: Nº SOLICITUD: FECHA PRESENTACIÓN:

2. TÍTULO DE LA INVENCION (4)

POLÍMERO PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO

3. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

(5) APELLIDOS Y NOMBRE /DENOMINACIÓN SOCIAL UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID				NIF/PASAPORTE Q28180141	
DIRECCIÓN POSTAL SECCIÓN DE CONTRATOS Y PATENTES OTRI-UCM C/ DONOSO CORTÉS, 65 28015 MADRID		CÓDIGO POSTAL Y LOCALIDAD 28015 MADRID	PROVINCIA MADRID	PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA	CODIGO PAÍS RESIDENCIA ES
PAÍS DE NACIONALIDAD ESPAÑA		CÓDIGO PAÍS NACIONALIDAD ES	CNAE (6)	PYME (7)	
DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO otripat@ucm.es	Nº TELÉFONO FIJO 913946518	Nº TELÉFONO MÓVIL	(8) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE <input type="checkbox"/> CORREO POSTAL <input checked="" type="checkbox"/> CORREO ELECTRÓNICO		
PORCENTAJE DE TITULARIDAD (9): 100 %		NOTA: DE NO ESPECIFICARSE DICHO PORCENTAJE, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.			
EL SOLICITANTE TAMBIÉN (10) <input type="checkbox"/> SI ES INVENTOR:		<input checked="" type="checkbox"/> NO		MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: (11) <input checked="" type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____	
(12) EL SOLICITANTE ES UNA UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA			<input checked="" type="checkbox"/> SI		

4. OTROS SOLICITANTES Y/O INVENTORES (13)

LOS DEMAS SOLICITANTES Y/O INVENTORES SE INDICAN EN HOJA COMPLEMENTARIA

Ejemplar para el

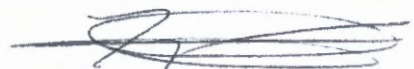
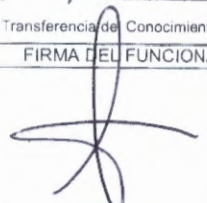
5. IDENTIFICACIÓN DEL REPRESENTANTE

(14) REPRESENTACIÓN		(15) Nº PODER GENERAL	
<input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ESTÁ REPRESENTADO	EL SOLICITANTE ESTÁ REPRESENTADO POR:	<input type="checkbox"/> AGENTE DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL	<input type="checkbox"/> OTRO REPRESENTANTE
(16) ACTUACIÓN POR MEDIO DE AGENTE	NOMBRE	CÓDIGO DE AGENTE	
(17) ACTUACIÓN POR MEDIO DE OTRO REPRESENTANTE	NOMBRE	DIRECCIÓN POSTAL	N.I.F.
DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO	Nº TELÉFONO	(18) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE	
		<input type="checkbox"/> CORREO POSTAL <input type="checkbox"/> CORREO ELECTRÓNICO	

6. OTROS DATOS

(19) REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD	PAIS ORIGEN	CODIGO PAÍS	FECHA	NÚMERO
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
(20) EXPOSICIONES OFICIALES	NOMBRE		FECHA	LUGAR
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
(21) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO	AUTORIDAD DE DEPÓSITO	CODIGO PAÍS	FECHA	NÚMERO
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
LISTAS DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS				
La descripción contiene un listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Se adjunta un soporte de datos legible por ordenador que incluye el listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
El solicitante declara por medio de esta instancia, que la información registrada en el soporte de datos legible por ordenador es idéntica a la contenida en el listado de secuencias biológicas incluido en la descripción de la versión escrita de esta solicitud <input type="checkbox"/>				
(22) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES				<input type="checkbox"/> SI

7. ÍNDICE DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN / FECHA Y FIRMA (23)

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN. Nº PÁGINAS: 1-9 <input checked="" type="checkbox"/> Nº DE REIVINDICACIONES: 11 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº PÁGINAS: 14-14 <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS. Nº PÁGINAS: <input type="checkbox"/> SOPORTE LEGIBLE POR ORDENADOR DE LISTA DE SECUENCIAS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> FIGURA A PUBLICAR EN BOPI Nº: ____ <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> SOLICITUD CAP <input type="checkbox"/> OTROS:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE  Vicerrector de Transferencia de Conocimiento y Emprendimiento FIRMA DEL FUNCIONARIO 
---	--	---

Ejemplar para el ...

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SOLICITANTES (2)

(3) APELLIDOS Y NOMBRE/ DENOMINACIÓN SOCIAL/ INFORMACIÓN RELATIVA A UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA/FIRMA	PAÍS NAC.	CÓD. NAC.	NIF/ PASAPORTE	(4) ESTA PERSONA TAMBIÉN ES INVENTOR:	(5) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI FIRMA:				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI FIRMA:				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI FIRMA:				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI FIRMA:				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI FIRMA:				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %

NOTA: DE NO ESPECIFICARSE EL PORCENTAJE DE TITULARIDAD, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS INVENTORES (Incluir sólo aquellos inventores que no figuren como solicitantes) (6)

APELLIDOS Y NOMBRE	PAÍS NACIONALIDAD	CODIGO NAC.	NIF/PASAPORTE
MUÑOZ OLIVAS, MARÍA RIANSAIRES	ESPAÑA	ES	04581922T
CÁMARA RICA, CARMEN	ESPAÑA	ES	13044627Q
MANCHEÑO REAL, MARÍA JOSÉ	ESPAÑA	ES	51906738Q
ZARCO FERNÁNDEZ, SONIA	ESPAÑA	ES	46863816M

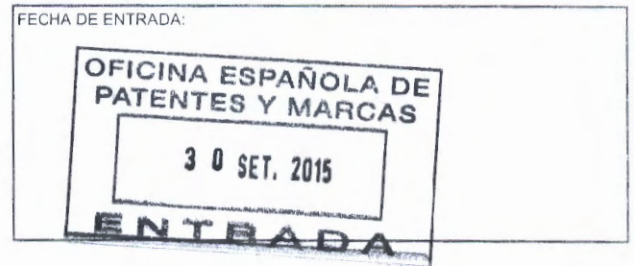
4. OTROS DATOS

(7) EXPOSICIONES OFICIALES		
NOMBRE	FECHA	LUGAR

(8) REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD			
PAÍS ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	FECHA	NÚMERO

Ejemplar para el solicitante

SOLICITUD DE TRAMITACIÓN SEGÚN EL PROGRAMA DE CONCESIÓN ACELERADA DE PATENTES



1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

Nº DE SOLICITUD: P P 201500704	FECHA DE PRESENTACIÓN: 30 SEP 2015
--	--

2. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE (SI HAY VARIOS, INDÍQUESE EL PRIMERO)

APELLIDOS Y NOMBRE/DENOMINACIÓN SOCIAL
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

El abajo firmante solicita que se tramite según el Programa de Concesión Acelerada de Patentes la solicitud de patente indicada. Por tanto, simultáneamente solicita la realización del Informe sobre el Estado de la Técnica y que se publique antes de transcurrido el plazo de 18 meses desde la fecha de presentación de la misma, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 32.3 de la Ley 11/1986, de Patentes.

3. RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

<input type="checkbox"/> RESGUARDO ABONO TASA IET	NOMBRE Y FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE Vicerrector de Transferencia del Conocimiento y Emp
<input type="checkbox"/> OTROS:	





1

P 2 0 1 5 0 0 7 0 4

Título

Polímero para la inmovilización de especies de mercurio

Sector de la Técnica

- 5 La presente invención pertenece al campo de adsorbentes para descontaminación de suelos y/o aguas y tratamiento de residuos. De forma más concreta, se refiere a un material polimérico para la adsorción de mercurio en sus posibles estados.

Estado de la técnica

- 10 La elevada toxicidad del mercurio y, especialmente, de sus compuestos orgánicos, hace necesaria la búsqueda de métodos de limpieza y recuperación de espacios contaminados de manera realista y económica (*Remediation Techniques for Hg-Contaminated Sites*. M. Hempel, J. Thoeming In: Mercury Contaminated Sites, Characterization, Risk Assessment and Remediation, R.Ebinghaus, R.R. Turner, L.D. de Lacerda, O. Vasiliev and W. Salomons (Eds.), SpringerPublishing, New York, NY., 1999, p. 113-130).

Existen técnicas externas (*ex-situ*) en las que se separan físicamente el suelo o material contaminado (excavados) y, generalmente, se tratan térmicamente para recuperar después el Hg. Otro tratamiento muy aplicado a los suelos excavados son los agentes extractantes como hipoclorito sódico (*Treatment technologies for mercury in soil, waste, and water*; EPA Report EPA-542-R-07-003, United States Environmental Protection Agency (EPA), 2007).

- 25 Las técnicas *in-situ* están menos implementadas que las anteriores pero se tiende a su implementación en todos los ámbitos. Generalmente, implican la extracción del Hg con vapor caliente mediante agentes lixiviantes que solubilicen el Hg para recuperarlo. Sin embargo, las agencias reguladoras no son partidarias de adicionar compuestos químicos muy reactivos a suelos ya contaminados (*Fractionation studies of mercury in soils and sediments: a review of the chemical reagents used for mercury extraction*, N. Issaro, C. Abi-Ghanem, A. Bermond, Analytica Chimica Acta, 2009, 631(1), 1-
- 30

12). Además, no sirve para compuestos que pueden estar fuertemente adsorbidos en la fracción del suelo (como HgS) y que pueden ir lixiviando muy lentamente.

La bioremediación también es una alternativa; sin embargo, es un proceso muy lento que plantea el problema de limitar el acceso de las plantas hipercacumuladoras a la fauna, que podría verse afectada (*Current research for bioremediation of mercury*, I. Wagner-Dobler, In: *Bioremediation of mercury*, Edited by Wagner-Dobler, Irene, **2013**, 1-16).

10 Cuando es muy difícil aplicar cualquiera de los métodos anteriores, se recurre a métodos de contención que suelen emplear barreras impermeables (bentonita + suelo nativo) y, por último, los métodos de inmovilización y solidificación que conllevan la mezcla en suelos excavados o *in-situ* de materiales que estabilizan el mercurio mediante formación de especies muy insolubles o muy estables en las condiciones físico-químicas de la zona.

Dentro de estos estabilizantes, se han empleado, de forma más clásica, materiales inorgánicos como carbonato cálcico, silicatos, cenizas volantes, zeolitas, arcillas o carbón activo; pero tienen una débil afinidad por el Hg y, por tanto, poca capacidad de retención (*Mercury removal from water by ion exchange resins adsorption*, S. Chiarle, M. Ratto, M. Rovvati, *Water Res.*, **2000**, 34, 2971–2978; *Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review*, S. Babel, T.A. Kurniawan, *J Hazard Mater*, **2003**, 97:219–243; *Removal of heavy metals from water by means of natural zeolites*, G. Blanchard, M. Maunaye, G. Martin, *Water Res.*, **1984**, 18, 1501–1507). Por ello, se han sintetizado numerosos polímeros orgánicos mucho más selectivos y, por tanto, más eficientes por su mayor capacidad de captar mercurio (*Usage of chitosan on the complexation of heavy metal contents and vertical distribution of Hg(II) and Cr(VI) in different textural artificially contaminated soils*, Y. Huan, L. Gang, *Environ Earth Sci*, **2015**, 73:2483–2488; *Recovery Material for Mercury Ions Based on a Polyallylamine Hydrogel with Thiourea Groups at Cross-Linking Points*, N. Daisuke, D. Takehiro, K. Satoshi, I. Kenji, *Industrial and Engineering Chemical Research*, **2014**, 53, 3300; *Mercury nano-trap for effective and*

- efficient removal of mercury(II) from aqueous solution*, L. Baiyan, Z. Yiming, M. Dingxuan, S. Zhan, M. Shengqian, Nature Communications, DOI: 10.1038/ncomms6537; *Chelating resins for mercury extraction based on grafting of polyacrylamide chains onto styrene-divinylbenzene copolymers by gamma irradiation*, L.C. Costa, A.S. Gomes, F. Coutinho, V.G. Teixeira, Reactive & Functional Polymers, **2010**, 70, 738-746).

Por otro lado, se estima que la emisión anual de mercurio a la atmósfera, procedente de la actividad industrial, está en torno a 1.000 – 6.000 T/año, lo cual constituye un problema medioambiental sumamente grave. La inyección de adsorbentes sólidos ha demostrado ser un método eficaz en la captura del mercurio gas, siendo el carbón activo impregnado con distintos componentes el de mayor disponibilidad comercial (*Adsorbents for capturing mercury in coal-fired boiler flue gas*, H. Yanga, Z. Xua, M. Fanb, A. E Blandc, R. R. Judkins Journal of Hazardous Materials, **2007**,146, 1–11).

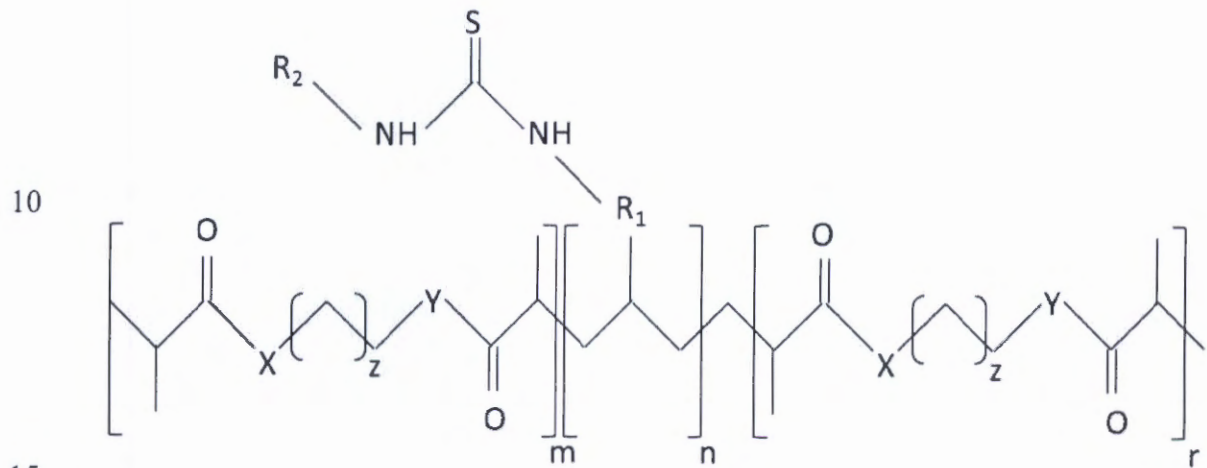
Aun así, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos materiales altamente eficaces en la captura de mercurio que, además, presenten una afinidad selectiva hacia el mercurio en presencia de otros gases habituales en atmósferas de combustión constituyendo, por tanto, uno de los retos actuales en la protección del medio ambiente.

Descripción detallada de la invención

Polímero para la inmovilización de especies de mercurio.

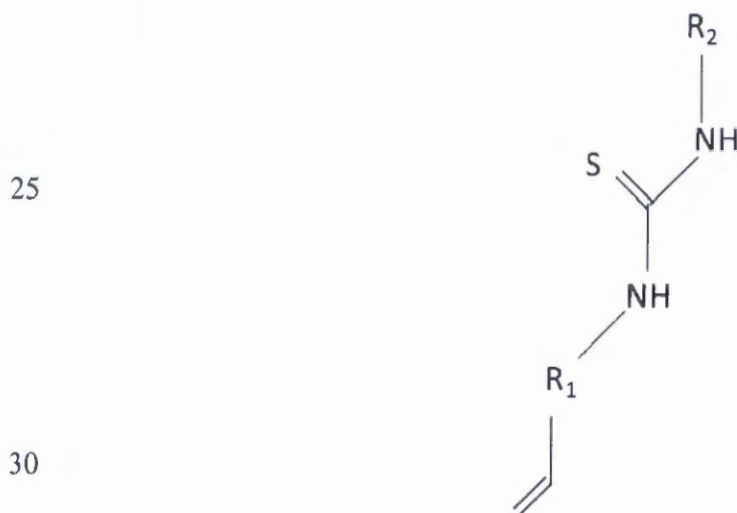
En la presente invención se propone un nuevo material polimérico con elevada selectividad y capacidad de retención hacia diferentes especies de mercurio. Presenta alta eficacia tanto en matrices salinas como agua de mar sin necesidad de tratamiento previo de la muestra. Su aplicación en muestras medioambientales, como son los lixiviados procedentes de antiguas minas de mercurio, ha demostrado que el polímero tiene una capacidad de retención superior al 95%. Adicionalmente, se ha comprobado que su capacidad de retener mercurio elemental es muy elevada y con una cinética extremadamente rápida.

La síntesis del polímero (de fórmula general I) se lleva a cabo mediante polimerización utilizando como reactivos un monómero derivado de tiourea (de fórmula general II, donde R_1 y R_2 son grupos arilo o alquilo), y un entrecruzante (de fórmula general III donde $z \leq 3$, y R_3 y R_4 pueden ser hidrógeno, metilo, alquilo o arilo) en presencia de un iniciador radicalario y un disolvente.



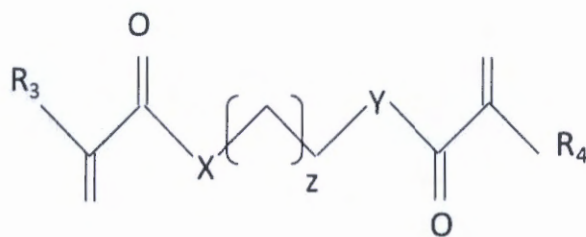
X: O, NH, S
 Y: O, NH, S
 $z \leq 3$
 $m, n, r \geq 1$

20 (I)



(II)

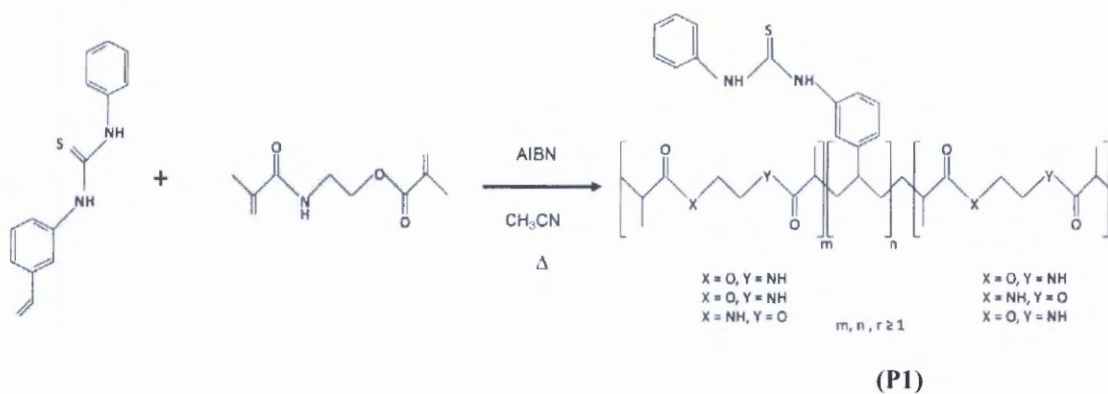
5



(III)

10 En el Esquema 1 se muestra la síntesis, para un caso concreto, del polímero (P1) donde se emplea como monómero 1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea y como entrecruzante acritalo de 2-acriiloilamidoetilo (NOBE), en presencia de azobisisobutironitrilo (AIBN) en acetonitrilo como disolvente.

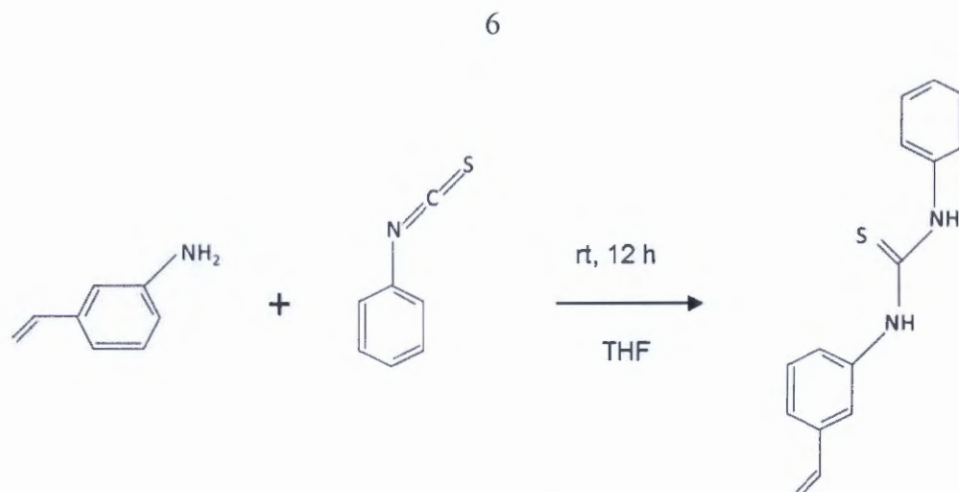
15



20

Esquema 1

El monómero I (1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea) se puede sintetizar a partir de una disolución de fenilisocianato añadiendo 3-vinilalanina en THF (esquema 2)



Esquema 2

El polímero obtenido puede constituir una herramienta novedosa como sistema de
 5 limpieza de aguas residuales, vertidos o lixiviados procedentes de fuentes antropogénicas de mercurio, así como elemento de destoxificación de espacios en los que dicho elemento se encuentre presente en cualquiera de sus formas más volátiles, como puede ser la emisión de mercurio procedente de la actividad industrial.

10 **Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el esquema general del método empleado para la retención de las especies de mercurio y validación utilizando el polímero descrito (P1).

La figura 2 muestra el esquema de retención del mercurio vapor mediante el polímero
 15 (P1).

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

20

Se utilizan técnicas de Schlenk para las reacciones sensibles a la humedad. La purificación del monómero se lleva a cabo mediante cromatografía en columna con Silica gel (Merk, 230-400 mesh). Los espectros de RMN se registran a 22⁰C in CDCl₃ en un Bruker Avance DPX 300 (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Los espectros de
 25 IR se realizan con un espectrómetro Brüker Tensor 27 (MIR 8000-400 cm⁻¹). Los espectros de masas (MS /EI) se realizaron en un espectrómetro MAT95 XP.

El polímero se testa mediante su estudio en cartuchos de extracción en fase sólida, optimizando la retención. La cuantificación y validación del mercurio se lleva a cabo mediante las técnicas CV-AFS y la utilización del equipo DMA-80.

5

Ejemplo 1

En este ejemplo se muestra la síntesis del monómero 1, 1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea (Esquema 2).

- 10 Sobre una disolución de fenilisocianato (1.1 mmol) se añade 3- vinilanilina (1 mmol) en THF. La mezcla se agita a temperatura ambiente toda la noche. El disolvente se elimina a vacío y la mezcla de reacción se purifica por cromatografía en gel de sílice (Hexano/DCM).
- 15 Se obtiene 1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea como un aceite blanco altamente viscoso (90%). ^1H RMN(CDCl_3): 7.79 (bs, 2 H, NH), 7.45-7.26 (m, 9 H, ArH), 6.69 (dd, $J = 17$, $J = 11$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5.31 (d, $J = 17$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3): 139.0, 137.4, 137.1, 135.8, 129.5, 129.4, 126.9, 125.1, 124.7, 124.4, 122.8. IR (DCM): 3361, 3175, 3044, 1596, 1582, 1524, 1493, 1262, 730, 692 cm^{-1} . MS(EI):
- 20 254.09 (M^+ , 36%), 228.1 (61%), 161 (63%), 135 (77%), 119 (81%), 93 (100%), 77 (85%).

Ejemplo 2

En este ejemplo se representa la síntesis del polímero P1 (esquema 1).

25

- La polimerización se llevó a cabo en botes topacio en atmósfera de argón, utilizando una placa calefactora con agitación, manteniendo una temperatura de 65 °C con agitación constante durante 24 h. El procedimiento a seguir fue el siguiente: se introducen 0,13 mmol (35 mg) del monómero **1** disueltos en 4 mL de acetonitrilo
- 30 (pureza HPLC), 3 mmol de NOBE (600 mg) y posteriormente el iniciador (AIBN). La mezcla se agita a 65 °C durante 24 h. El precipitado obtenido se filtra, se lava con MeCN y se seca obteniéndose 400 mg de un sólido blanco.

Ejemplo 3

En este ejemplo se muestra la retención de distintas especies de Mercurio. (Figura 1) sobre el polímero P1.

5

Se utiliza el material polimérico como soporte en cartuchos de vidrio de 6 mL dotados con fritas de teflón de 0,22 micras. La cantidad depositada en los cartuchos fue de 10 mg de polímero, llevándose a cabo la retención del mercurio, tras acondicionar el polímero de forma adecuada:

- 10
- Acondicionamiento del material con 1 mL de HCl 2M en metanol y 1 mL H₂O Milli-Q
 - Carga: 0.2 mL de distintas concentraciones de Hg (II) y CH₃Hg en agua, tanto individual como conjuntamente.

- 15 La capacidad máxima de absorción del polímero encontrada fue de 1 g de Hg/g polímero (tanto para el Hg²⁺ como para el CH₃Hg), sin haberlo llegado a saturar en ningún caso.

Ejemplo 4

- 20 Aplicación a muestras reales: lixiviados procedentes de minas de mercurio.

En primer lugar las muestras se estabilizan con 0,1 M de ácido nítrico para su conservación. A continuación se procede a realizar las etapas descritas previamente.

- 25 Los resultados obtenidos nos revelan una retención de Hg en cualquiera de sus formas solubles >95%. Las concentraciones nominales de Hg en los lixiviados suministrados por MAYASA: MH, ME, M21, M22, M23 eran de 8, 21, 33, 16, 1280 µg/L, respectivamente.

Ejemplo 5

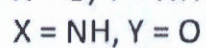
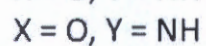
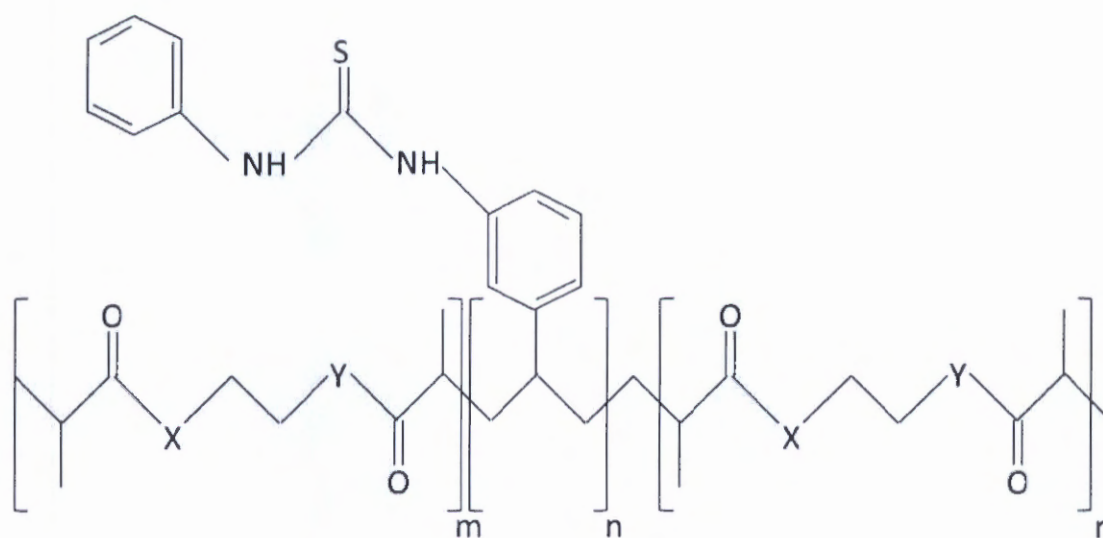
- 30 Se muestra la retención del mercurio vapor (Figura 2).

Se utilizan 25 mg del material polimérico como filtro, entre dos fritas tal y como se especifica en la figura 4 (2). La generación de mercurio elemental vapor se ha llevado a cabo por reducción de HgCl_2 con SnCl_2 (1). La capacidad máxima de absorción encontrada fue de 1.57 mg de Hg/g polímero.

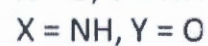
5

Los resultados permiten demostrar la existencia de selectividad de este material hacia el mercurio al realizar un estudio de reactividad cruzada.

Por otro lado, el estudio de las isotermas permite afirmar la alta afinidad del material
10 obtenido hacia el mercurio en sus diversas formas.



$$m, n, r \geq 1$$

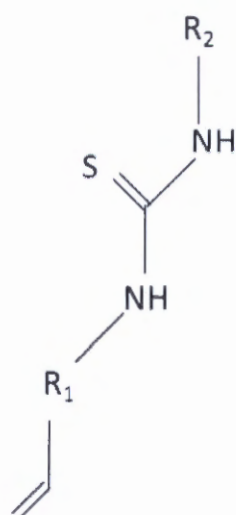


(P1)

- 5 3. Procedimiento de síntesis del polímero de fórmula general I mediante polimerización radicalaria de un monómero derivado de tiourea (II):

10

15

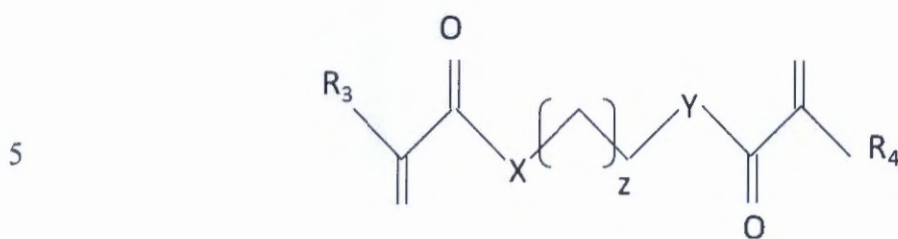


(II)

20

donde R_1 y R_2 puede ser grupos arilo o alquilo

y un entrecruzante (III):



(III)

10 donde $z \leq 3$, y R_3 y R_4 pueden ser hidrógeno, metilo, alquilo o arilo

en presencia de un iniciador radicalario y un disolvente.

4. Procedimiento de síntesis del polímero de fórmula P1, según reivindicación 2,
15 mediante polimerización radicalaria de 1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea y acrilato de 2-acriloilamidoetilo (NOBE).
5. Procedimiento de síntesis del polímero de fórmula general P1, según
reivindicación 4, en presencia de azobisiobutironitrilo como iniciador y
20 acetonitrilo como disolvente, manteniendo una temperatura de 65°C con agitación constante durante 24 horas y, posteriormente, filtrando y lavando el precipitado obtenido.
6. Procedimiento de síntesis del monómero 1-fenil-3-(3-vinilfenil) tiourea a partir
25 de una disolución de fenilisocianato añadiendo 3-vinilalaina en THF y agitando a temperatura ambiente.
7. Uso del polímero de fórmula general I, según reivindicación 1, como medio de
captura de especies de mercurio.
- 30 8. Uso del polímero de fórmula P1, según reivindicación 2, como adsorbente para preconcentración de muestras en el análisis de especies de mercurio.

9. Uso del polímero de fórmula P1, según reivindicación 2, como sorbente de emisiones de mercurio procedente de la actividad industrial.
- 5 10. Uso del polímero de fórmula P1, según reivindicación 2, para descontaminación de suelos o aguas.
11. Uso del polímero de fórmula l P1, según reivindicación 2, para limpieza y recuperación de medios contaminados con mercurio.

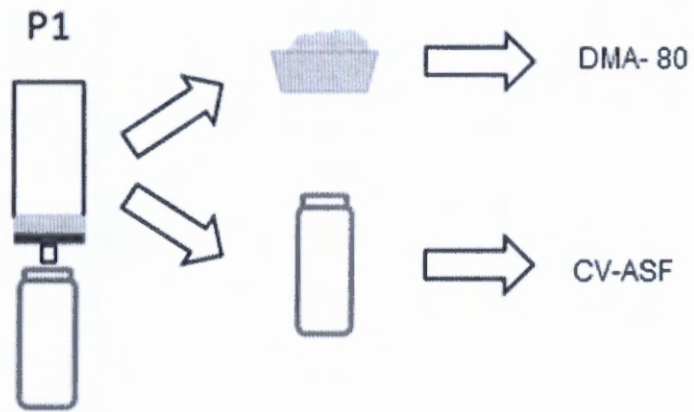


Figura 1

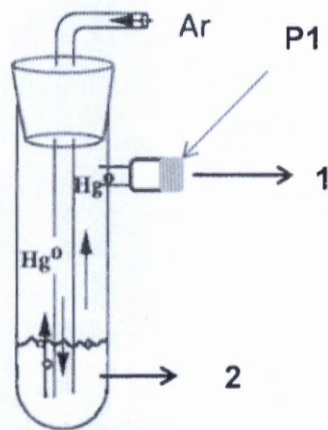


Figura 2

RESUMEN

Polímero para la inmovilización de especies de mercurio

5 La elevada toxicidad del mercurio hace necesaria la búsqueda de métodos de limpieza y recuperación de espacios contaminados. Se presenta un nuevo material polimérico altamente eficaz en dicha captura que presenta, además, una afinidad selectiva hacia distintas especies de mercurio.

10 El polímero se obtiene por polimerización radicalaria de un monómero derivado de tiourea y NOBE.

15 El nuevo material puede constituir una herramienta novedosa como sistema de limpieza en aguas residuales, vertidos o lixiviados procedentes de fuentes antropogénicas de mercurio, así como elemento de detoxificación de espacios en los que el mercurio se encuentre presente en cualquiera de sus formas más volátiles.